



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA ACTIVIDADE *IN VIVO* DE  
MINI-CELULOSOMAS DO *Clostridium thermocellum* EM DIETAS À BASE DE CEVADA  
PARA FRANGOS DE CARNE

LUÍS CARLOS SOARES SERRANO

CONSTITUIÇÃO DO JURI

PRESIDENTE

Doutor José Pedro Cardoso da Costa Lemos

VOGAIS

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira

Doutor Carlos Mendes Andrade Godinho Fontes

Doutora Maria de São José Sousa Deyrieux Centeno

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel dos Anjos  
Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutor Carlos Mendes Andrade  
Godinho Fontes

2012  
LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA ACTIVIDADE *IN VIVO* DE  
MINI-CELULOSOMAS DO *Clostridium thermocellum* EM DIETAS À BASE DE CEVADA  
PARA FRANGOS DE CARNE

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

LUÍS CARLOS SOARES SERRANO

CONSTITUIÇÃO DO JURI

PRESIDENTE

Doutor José Pedro Cardoso da Costa Lemos

VOGAIS

Doutor Luís Manuel dos Anjos Ferreira

Doutor Carlos Mendes Andrade Godinho Fontes

Doutora Maria de São José Sousa Deyrieux Centeno

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel dos Anjos  
Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutor Carlos Mendes Andrade  
Godinho Fontes

2012  
LISBOA

---

## **Agradecimentos**

A toda a equipa do Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina Veterinária (UTL),  
Ao Professor Doutor Luís Ferreira, que prontamente me recebeu e integrou na sua equipa de trabalho, pelo seu constante apoio e motivação, pelos ensinamentos e toda a dedicação ao longo deste trabalho. As suas palavras, a boa disposição e entusiasmo pela investigação foram um exemplo e inspiração ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes, por toda orientação nos trabalhos desenvolvidos, a partilha de conhecimentos, pelo seu constante apoio, motivação, confiança, boa disposição, e pelo exemplo único e inspirador que é.

À Teresa Ribeiro, que desde o primeiro dia sempre se mostrou disponível para me ensinar e partilhar os seus conhecimentos e experiência que foram indispensáveis no percurso deste trabalho, pela paciência, boa disposição e exemplo.

À Mónica Costa, pela colaboração ao longo dos trabalhos de laboratório e de campo.

À Lena e Pedro Bule, pela colaboração no abate dos frangos, pelo constante apoio no laboratório, em especial à Lena, pela sua paciência, disponibilidade, e ensinamentos.

Aos colegas de bancada, Immacolata Vendetto, Kate Cameron, Joana Brás, por toda a ajuda, ensinamentos, os bons momentos passados no laboratório e fora dele, e pelo vosso exemplo de trabalho.

À D<sup>a</sup> Paula, pela sua simpatia, alegria e constante disponibilidade para ajudar.

À Inês Viegas, Susana, Virgínia e Shabir, pelo vosso exemplo, pelos bons momentos passados, as alegres, e educativas, conversas da hora de almoço e toda a ajuda.

Ao pessoal do Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia, nas pessoas do Sr. Eng.<sup>o</sup> Bruno Correia e Professora Doutora Madalena Lordelo, por toda a disponibilidade para me ajudarem ao longo dos ensaios, pelos ensinamentos e pela ajuda na avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais.

Ao Professor Doutor Manuel Chaveiro Soares e à Valouro, pela sua disponibilidade, interesse e pela oferta dos animais.

À REAGRO, pela facilidade de comunicação, disponibilidade e por ter gentilmente cedido gratuitamente algumas das matérias-primas utilizadas para a alimentação dos animais.

Ao Eng<sup>o</sup> Luís Filipe, da Eurorações, pela disponibilidade apresentada para colaborar e partilhar conhecimentos e pelo trabalho extra que teve para nos fornecer a cevada.

À Eng<sup>a</sup> Teresa Costa da Indukern Portugal por gentilmente ter cedido gratuitamente a mistura comercial enzimática utilizada neste trabalho.

Ao Professor Doutor José Mestre Prates, pela colaboração sempre simpática e disponível, na utilização dos equipamentos do Laboratório de Bioquímica, e pela ajuda no abate das aves.

Ao pessoal da Oficina de Tecnologia, ao Professor António Barreto, pela disponibilização dos equipamentos da Oficina, e à Leninha e Zézinha pela ajuda prestada e pela boa disposição sempre manifestada, já desde o tempo das aulas de tecnologia.

A todos a quem tive o prazer de conhecer nesta passagem pela FMV,  
O Sr. Álvaro, Bruno, Carlos, Bruno do Bar e Ausenda, pela ajuda sempre pronta, pelos muitos bons momentos passados ao longo destes anos. À D<sup>a</sup> Elisa, e ao Sr. Ramiro, por estarem sempre disponíveis na procura de artigos, pela preocupação, companhia e boa disposição constante não só durante a redacção deste documento mas também ao longo de todas as infindáveis épocas de exames. Aos colegas do país que tive o prazer de conhecer na passagem pela ANEMVet. A todos os colegas, amigos que ficam destes anos. Um cumprimento especial ao Ricardo, Frouco, Inês, Jessi, Rita ‘Doxy’, Julieta, Rita Mendes, Carolina, Margarida e Chico.

Ao pessoal da música, pelos bons momentos que temos partilhado em palco e, em especial, fora dele, um abraço especial ao Nuno ‘Pato’, Ricardo ‘Kimbas’, Sandro ‘Dosha’, José ‘Karaté’ Vieira, Rafael, Rui ‘Sonika’, Samuel, Nuno Dias, Fernando Baioneta, Rui Fialho, Raul Godinho e “Eu”.

Ao Nuno Griné Antunes, pela ajuda constante, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelo exemplo de pessoa e veterinário que é.

Ao ‘pessoal’ de Arruda, Susana, Telmo, Carlos ‘Xoné’, Iolanda, Artur, Dyana, Tânia, Sílvia, incansáveis amigos que sempre têm estado comigo, que perguntam “então, já és veterinário?”, pela vossa força, pelos muitos bons momentos, que continuemos sempre.

À minha família, que tornou tudo possível, que tem estado sempre presente para mim e tem sido um exemplo de vida a seguir. Aos que já cá não estão entre nós, cuja marca e exemplo nas nossas vidas estarão sempre presentes. Aos meus pais, digamos, por tudo e mais alguma coisa. À minha irmã. Aos meus avôs Lino e Soares, que responsabilizo, respectivamente, pelo meu interesse desde sempre pela agricultura e pelas novas tecnologias; a todos o meu muito obrigado por tudo.

## RESUMO

### **Contribuição para o estudo da actividade *in vivo* de mini-celulosomas do *Clostridium thermocellum* em dietas à base de cevada para frangos de carne**

A eficiência da transformação dos alimentos para animais em produtos edíveis tem elevado impacto na avicultura, suscitando uma análise científica e económica detalhadas. A utilização de enzimas para um melhor aproveitamento das matérias-primas, e diminuição dos efeitos nefastos dos polissacáridos não amiláceos é uma prática estabelecida.

Neste trabalho, é avaliada a possibilidade de uso de menores dosagens de enzimas na suplementação de dietas à base de cevada para frangos de carne, com vista a uma melhor avaliação da actividade de novas enzimas recombinantes. Os resultados mostraram que uma dosagem de 50% da mistura comercial Rovabio Excel AP são suficientes para haver uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos desempenhos produtivos dos animais suplementados relativamente ao grupo controle. É também avaliada a actividade *in vivo* de dois mini-celulosomas construídos com base no do *Clostridium thermocellum*, com uma e três coesinas, respectivamente, acopladas a uma endo-glucanase, dita Cel8A, do mesmo microrganismo. Apesar destes constructos terem apresentado uma relativa ineficiência no desempenho produtivo das aves, foram avaliados a presença de inibição de celulasas no alimento utilizado e do impacto da celulose cristalina na sua actividade. Os resultados sugerem uma ausência de factores que tenham inibido as enzimas utilizadas, sendo apontadas novas perspectivas para uma melhor avaliação de novas enzimas recombinantes *in vivo* em trabalhos futuros.

**Palavras-chave:** Frangos de carne, polissacáridos não amiláceos, suplementação enzimática, celulosoma.



## ABSTRACT

### **Contribution for the study of *in vivo* activity of *Clostridium thermocellum* mini-celulosomes in broilers fed on barley based diet**

Feed conversion efficiency has a major impact in poultry production, being the object of a detailed scientific and economic analysis. The use of enzymes to improve the nutritive value of feedstuffs and to reduce the anti-nutritive effects from the non-starch polysaccharides is a well established procedure.

In this work we evaluate the possibility of lower enzyme dosages to supplement barley based diets for broilers, aiming to better activity evaluation of new recombinant enzymes. Results show that a 50% dosage of the commercial mix Rovabio Excel AP is enough for a significative difference ( $p>0,05$ ) on broiler performance when compared to the control group. We also assessed the *in vivo* activity of two mini-celulosomes designed from *Clostridium thermocellum*, with one and three coesins, respectively, coupled to the endoglucanase Cel8A from the same microorganism. Although these enzymes show a relative inefficiency improving the broilers performance, cellulase inhibitor factors and the impact of crystalline cellulose on enzyme activity were evaluated. Results suggest the absence of inhibitor factors. New perspectives for a better evaluation of recombinant enzymes *in vivo* are proposed for future studies.

**Key-words:** Broilers, non-starch polysaccharides, enzymatic supplementation, celulosome.





## Índice

Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iv
Abstract .....	vi
Índice .....	viii
Índice de figuras .....	x
Índice de quadros .....	ix
Lista de Abreviaturas .....	xi
1. Breve descrição das actividades de estágio .....	1
2. Revisão bibliográfica .....	2
2.1. Introdução .....	2
2.2. Sector avícola – Caracterização .....	3
2.2.1 Avicultura – Mundo e Portugal .....	3
2.2.2. Sistemas de produção .....	5
2.2.3. Raças e estirpes .....	6
2.2.4. Alimentação e Maneio .....	6
2.3. Suplementação enzimática na produção avícola .....	8
2.3.1 História, actualidade, valor de mercado .....	8
2.3.2 Parede das células vegetais .....	8
2.3.2.1 Polissacáridos não amiláceos .....	10
2.3.2.1.1 Polissacáridos Não Amiláceos (PNA) na alimentação de aves .....	12
2.3.2.1.2 PNA Insolúveis .....	13
2.3.3 Enzimas .....	14
2.3.3.1 Enzimas activas em hidratos de carbono (CAZy) .....	14
2.3.3.2 Mecanismos de acção das hidrolases glicosídicas .....	15
2.3.3.3 Módulos não catalíticos .....	16
2.3.3.4 O Celulosoma .....	18
3. Objectivos .....	20
4. Material e métodos .....	21
4.1 Procedimentos laboratoriais .....	21
4.1.1 Procedimentos gerais .....	21
4.1.2 Produção de enzimas recombinantes .....	21
4.1.2.1 Transformação de células competentes .....	21
4.1.2.2 Hiper-expressão de proteínas recombinantes .....	22
4.1.2.3 Purificação de proteínas .....	22
4.1.2.4 Determinação da concentração de proteína de uma solução .....	23
4.1.3 Determinação da actividade enzimática .....	24
4.1.3.1 Ensaio de actividade enzimática .....	24
4.1.3.2 Determinação da actividade enzimática endógena da cevada .....	25
4.1.3.3 Avaliação da actividade enzimática dos conteúdos gastrointestinais .....	25
4.1.4 Avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais .....	26
4.2 Ensaio com animais .....	26
4.2.1 Aspectos comuns .....	26
4.2.1.1 Elaboração do alimento composto .....	26
4.2.1.2 Sala e preparação da sala .....	27
4.2.1.3 Frangos .....	27
4.2.1.4 Preparação da enzima para adição ao alimento composto .....	27
4.2.2 Ensaio 1 – Efeitos da incorporação enzimática nos alimentos para aves .....	28
4.2.2.1 Registos .....	28
4.2.3 Ensaio 2 – Avaliação da actividade <i>in vivo</i> de dois mini-celulosomas .....	28
4.2.3.1 Registos .....	28
4.3 Análise estatística .....	28
5. Trabalhos experimentais .....	29
5.1 Determinação da actividade enzimática endógena da cevada .....	30
5.1.1 Introdução .....	30
5.1.2 Resultados e Discussão .....	30

5.2 Ensaio 1 – Efeitos da incorporação enzimática nos alimentos para aves .....	32
5.2.1 Introdução .....	32
5.2.2 Resultados e Discussão .....	33
5.3 Ensaio 2 – Avaliação da actividade <i>in vivo</i> de dois mini-celulosomas.....	35
5.3.1 Introdução .....	35
5.3.2 Resultados e Discussão .....	36
6. Conclusão.....	44
7. Bibliografia .....	46
ANEXOS.....	53
ANEXO I - REAGENTES .....	53
ANEXO II - Meios de cultura e soluções .....	55
ANEXO III – Protocolo adaptado AZO-BARLEY (Megazyme).....	58
ANEXO IV – Constituição detalhada do alimento composto .....	59
ANEXO V – Rovabio® Excel AP .....	60

## Lista de quadros

<b>Quadro 1</b> - Consumo <i>per capita</i> (kg) de carne na União Europeia (EU) durante 2009. ....	4
<b>Quadro 2</b> - Constituição de PNA solúveis, insolúveis e totais, e concentração dos principais PNA na matéria seca (% MS).. ....	10
<b>Quadro 3</b> - Solução DNSA. ....	24
<b>Quadro 4</b> - Incorporação de ingredientes no alimento composto.....	26
<b>Quadro 5</b> - Actividade enzimática endógena dos lotes de cevada recolhidos, avaliada através do protocolo comercial AZO-BARLEY (Megazyme). ....	30
<b>Quadro 6</b> - Indicadores de crescimento de frangos alimentados com uma dieta à base de cevada não suplementada (CN) e suplementada com uma mistura comercial de enzimas, beta-glucanases, incorporada de acordo com a recomendação do fabricante 100% (R100), a 75% (R75) e a 50% (R50). ....	33
<b>Quadro 7</b> – Actividade catalítica das duas enzimas recombinantes GH8C1 e GH8C3 e da mistura comercial Rovabio Excel AP, foi determinada em tampão PC, 50 mM, pH 6,5 a 40 °C, usando o substrato $\beta$ -Glucano da cevada (Barley Beta-Glucan, Megazyme). ....	37
<b>Quadro 8</b> - Indicadores produtivos de frangos de carne alimentados com uma dieta à base de cevada suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura enzimática comercial (CP) e uma dieta não suplementada (CN). ....	38
<b>Quadro 9</b> – Peso e comprimento relativo dos compartimentos gastrointestinais, e viscosidade dos respectivos conteúdos, de 40 frangos alimentados com uma dieta à base de cevada, suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura comercial (CP) e não suplementada (CN). ....	39
<b>Quadro 10</b> - Avaliação qualitativa da actividade enzimática sobre dois substratos ( $\beta$ -glucano e CM-Celulose) da digesta recolhida de compartimentos gastrointestinais de 40 frangos de carne alimentados com uma dieta à base de cevada, suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura comercial (CP) e não suplementada (CN). ....	40
<b>Quadro 11</b> – Avaliação da actividade enzimática das enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) e da mistura comercial (CP) excipientados e do excipiente (CN). ....	41

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Produção mundial de carne de aves entre 2007 e 2012. ....	3
<b>Figura 2</b> - Estrutura simplificada do sistema industrial integrado na produção de frangos de carne.....	5
<b>Figura 3</b> - Exemplo de um sistema de produção intensivo (esquerda) e semiextensivo (direita). ....	6

<b>Figura 4</b> - Esquema da estrutura da parede celular vegetal primária. ....	9
<b>Figura 5</b> - Celulose, polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações glicosídeas $\beta(1\rightarrow4)$ . ....	9
<b>Figura 6</b> - Estrutura de um $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucano ( $\beta$ -glucano), polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações glicosídeas $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ . ....	11
<b>Figura 7</b> - Estrutura de um arabinoxilano. ....	11
<b>Figura 8</b> - Mecanismo de retenção (a) e de inversão (b) de configuração. ....	15
<b>Figura 9</b> - Três principais sítios activos de hidrolases glicosídicas. ....	16
<b>Figura 10</b> - Esquema simplificado de um celulosoma do <i>Clostridium thermocellum</i> . ....	18
<b>Figura 11</b> - Exemplo de curva-padrão da concentração proteica de uma solução de albumina sérica bovina (ASB). ....	23
<b>Figura 12</b> - Exemplo de curva-padrão de glucose. ....	25
<b>Figura 13</b> - Taxa de reacção enzimática de ordem zero (independente da concentração de substrato) e efeito do aumento da concentração de produto na actividade observada da enzima. ....	32
<b>Figura 14</b> - Esquema simplificado dos complexos enzimáticos. ....	35
<b>Figura 15</b> - Visualizações da estrutura tridimensional obtida por crio-microscopia electrónica do mini-celulosoma com três coesinas (GH8C3), mostrando a estrutura atómica dos módulos das coesinas e doquerinas e o domínio catalítico Cel8A. ....	36
<b>Figura 16</b> - Análise após electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, SDS-PAGE de 14% (v/v) das fracções purificadas da GH8C3 e GH8C1. ....	36
<b>Figura 17</b> - Avaliação da actividade $\beta$ -glucanásica das duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) após incubação com o alimento composto produzido e submetido a tratamento térmico, e não submetido a tratamento térmico. ....	42
<b>Figura 18</b> - Avaliação da actividade enzimática após incubação com diferentes substratos solúveis e insolúveis. ....	43

## Lista de Abreviaturas

Å	Ångström
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albumina do Soro Bovino
<i>C. thermocellum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i>
CAZy	Carbohydrate-Active-enZymes
CBM	Carbohydrate-Binding Module
Cel8A	Celulase 8 <sup>a</sup>
CMC	Carboximetilcelulose
Da	Dalton
DNSA	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission
EPM	Erro padrão da média
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
g	Grama
GH8	Hidrolase glicosídica da família 8
GH8C1	Mini-celulosoma com uma coesina ligada a uma GH8
GH8C3	Mini-celulosoma com três coesinas, cada uma ligada a uma GH8
HEC	Hidroxietil-celulose
IACA	Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos Para Animais
IC	Índice de Conversão
INE	Instituto Nacional de Estatística
kg	Quilograma
LB	Meio de cultura de Luria Bertani
LBE	Meio de cultura de auto-indução
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Matéria Seca
Mt	Megatonelada
NSP	Non-Starch Polysaccharides
°C	Grau Celsius
P	Probabilidade
p/v	Peso por volume
pH	Simétrico do logaritmo (co-logaritmo) decimal da actividade hidrogeniónica
PNA	Polissacárido Não Amiláceo
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
U	Unidades enzimáticas
UTL	Universidade Técnica de Lisboa
v/v	Volume por volume

$\beta$ -glucano	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucano
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ mol	Micromole

## **1. Breve descrição das actividades de estágio**

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu entre 15 de Setembro de 2011 e 29 de Fevereiro de 2012 no Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (UTL) e no Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia da UTL. As actividades desenvolvidas incidiram na área de investigação científica de fronteira entre a biologia molecular e a nutrição de frangos de carne.

No decorrer do estágio tive oportunidade de me familiarizar com a aplicação de técnicas de biologia molecular e de bioquímica, no que concerne à produção e purificação de enzimas recombinantes, avaliação e determinação da actividade enzimática para diferentes substratos e avaliação de factores de inibição e, por fim, a inclusão destas enzimas em alimentos para animais. A realização destes trabalhos (cuja descrição detalhada se encontra na secção de Material e Métodos deste documento) permitiu o desenvolvimento de uma maior atenção ao detalhe, à consideração de todas as variáveis possíveis e um constante procurar de informação científica a cada passo dado. A título de exemplo, foram realizados um total de 98 ensaios de determinação de actividade enzimática, de forma a garantir a validade das observações feitas.

No Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (UTL) foi elaborado o alimento composto na Fábrica de Alimentos Compostos e realizados os dois ensaios *in vivo*, cada um com 160 frangos. A integração dos vários conhecimentos obtidos no decorrer do curso de Medicina Veterinária foi consolidada, nas áreas da nutrição e alimentação, da produção animal e medicina das populações, de modo a assegurar desde a qualidade do alimento composto, passando pelas condições de produção dos frangos, avaliação de parâmetros produtivos e, por se garantirem as condições higio-sanitárias dos bandos.

Por fim, a possibilidade de leccionar as aulas de Actividades Complementares aos colegas do segundo ano, além da experiência em si, levou a um consolidar dos conhecimentos das áreas de bioquímica e biologia molecular, e da integração que estas têm na abrangente área que é a medicina veterinária.

## **2. Revisão bibliográfica**

### **2.1. Introdução**

O consumo mundial de carne de frango tem visto um crescimento contínuo ao longo dos últimos anos. As qualidades nutricionais desta carne, assim como o baixo custo permitido pelo desenvolvimento das técnicas de produção e de selecção genética, vão ao encontro a um tipo de produto procurado pelo consumidor. A alimentação destes animais é feita, no mundo ocidental, com dietas à base de cereais. Alguns destes cereais contêm, em percentagens maiores ou menores, glúcidos complexos não digeríveis pelas enzimas próprias das aves. No entanto, a degradação da parede celular das plantas, e consequente aproveitamento da energia nelas contidas, pode ser efectuada por um reduzido número de microrganismos. A incapacidade das aves de degradarem estes polissacáridos deve-se à conhecida presença de factores anti-nutricionais. Os polissacáridos não amiláceos, com destaque para os arabinoxilanos e  $\beta$ -glucanos, presentes principalmente no trigo e cevada, respectivamente, levam a uma diminuição da performance das aves, por alterações da viscosidade da digesta e consequentes alterações do tracto gastrointestinal dos animais. A adição de enzimas para minimizar estes efeitos indesejados é uma prática produtiva estabelecida e amplamente utilizada na produção avícola.

Dos microrganismos capazes de degradar a celulose, os anaeróbios desenvolveram uma estrutura altamente complexa e modular que permite a integração de várias enzimas e módulos não catalíticos, para formarem o celulosoma, tornando mais eficiente a aproximação ao substrato e a degradação deste.

O isolamento, sequenciação e capacidade de produzir isoladamente os diversos constituintes destes microrganismos através das tecnologias da engenharia genética, permite-nos fazer a reconstrução dirigida de mini-celulosomas.

Neste trabalho é abordada a testagem e comparação de enzimas recombinantes *in vivo*, pela eficácia destas na suplementação de dietas à base de cevada para frangos de carne. Foi avaliada a possibilidade de utilizar dosagens menores de enzimas com finalidade de melhor comparação de actividade de diferentes enzimas recombinantes. O principal estudo visa a comparação de dois mini-celulosomas, com uma e três coesinas, respectivamente, e a avaliação de eventuais factores de inibição que levem à ineficiência destas enzimas *in vivo*.

Este trabalho é iniciado por uma revisão bibliográfica, enquadrando o leitor na produção avícola e nos fundamentos da utilização de enzimas. É depois dado ênfase à parede celular das células vegetais e, em maior detalhe, aos polissacáridos não amiláceos. Por fim, são referidos os mecanismos de acção enzimáticos das celulasas e a integração destas no celulosoma. Os objectivos do trabalho são definidos no capítulo 3. O material e métodos utilizados são descritos no capítulo 4 de uma forma global, sendo ao longo do capítulo 5



apresentados as especificidades e fundamento dos procedimentos, acompanhados por uma pequena introdução de cada assunto, seguida pelos resultados obtidos e discussão dos mesmos. Por fim são apresentadas as conclusões, de forma integrada, no capítulo 6.

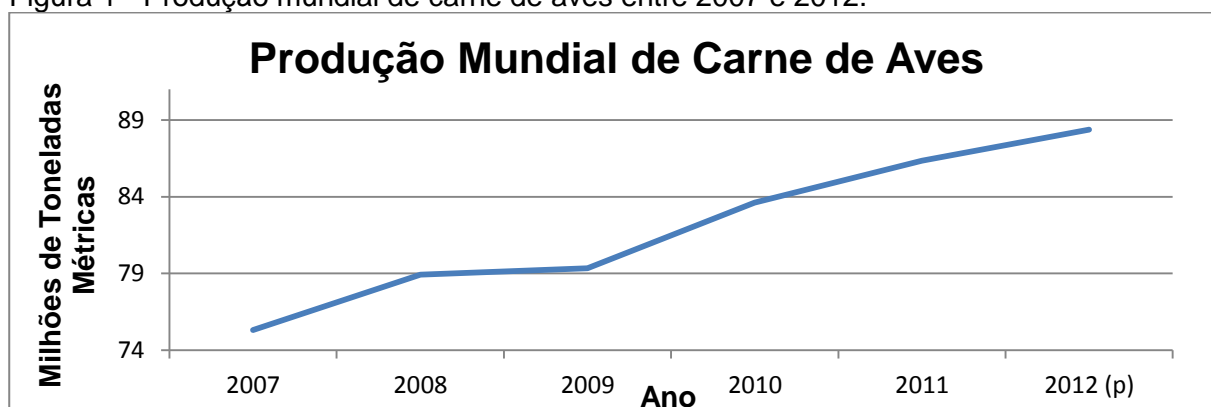
## 2.2. Sector avícola – Caracterização

### 2.2.1. Avicultura - Mundo e Portugal

Na segunda metade do século XX assistiu-se a um crescimento exponencial da indústria avícola que adoptou um modo de produção altamente especializado e tecnológico. A carne de frango e os ovos passaram a ser largamente utilizados na alimentação humana pelas suas características nutritivas e pelo seu baixo preço. Além disso, a indústria avícola disponibiliza, ainda, diversos subprodutos como penas, fígado, gorduras e outros (Field, 2004).

Este crescimento pode ser visto de duas formas: por um lado, do ponto de vista técnico onde a aplicação prática da selecção genética, dos conhecimentos da nutrição e do controlo de doenças, aliados a uma forte componente de gestão empresarial e integração da produção permite apresentar um produto de alta qualidade. Por outro lado, pode-se olhar para este crescimento sob o ponto de vista do consumidor, que procura, a um baixo preço, um produto seguro e saudável (Carbó, 1995). É com base nestes dois aspectos onde convergem as características intrínsecas da carne de aves, como o conteúdo proteico de elevada qualidade e facilmente digerível e um teor de gordura e colesterol mais baixos do que os apresentados pelas carnes vermelhas (Field, 2004), e as características produtivas conseguidas ao nível de índice de conversão alimentar (IC), um baixo custo unitário e a rapidez do ciclo biológico que tornam a carne de aves num produto altamente procurado e permitiram um rápido crescimento deste sector produtivo.

Figura 1 - Produção mundial de carne de aves entre 2007 e 2012.



Informação para 2012 é uma previsão; A produção é medida pelo peso do animal após abate e remoção dos órgãos internos, cabeça e penas. Fonte: USDA (2011).

A produção mundial de carne de aves tem mostrado um crescimento contínuo a nível mundial, acompanhado pelo seu consumo, que quase quadruplicou desde a década de 1960, de 3 kg *per capita* em 1963 para 11 kg em 2003 (FAO, 2010). Com uma previsão de

aumento de produção de 3% em 2012 relativamente à produção mundial de 2011 (Figura 1), os maiores produtores a nível mundial são os Estados Unidos da América (16,603 Mt), China (13,800 Mt) e Brasil (13,603 Mt) (USDA, 2011), apresentando-se o Brasil como o maior exportador e com melhores perspectivas de crescimento, devido a uma maior estabilidade na produção dada pela elevada produção de matéria-prima. A nível europeu verifica-se também um aumento de consumo da carne de aves de capoeira (USDA, 2011). Dados europeus de 2011 (Quadro 1) mostram uma média de consumo anual de 22 kg *per capita* que varia entre 15 kg no Luxemburgo e 45 kg no Chipre (Eurostat, 2011). Portugal mostra-se acima da média de consumo europeu *per capita*, com um valor de 34 kg em 2009, que representa um aumento quando comparado com o valor registado em 2007, de 29,8 kg *per capita* (Eurostat, 2008).

Quadro 1 - Consumo *per capita* (kg) de carne na União Europeia (EU) durante 2009.

	Bovino	Aves	Porco	Pequenos Ruminantes
UE <sup>(1)</sup>	15	22	37	3
BE	18	-	40	-
BG	5	22	24	2
CZ	-	-	-	-
DK	26	26	81	-
DE	13	18	54	1
EE	14	21	44	1
IE	20	26	33	3
EL	6	30	8	9
ES	-	-	-	-
FR	26	23	34	4
IT	23	19	38	1
CY	9	45	72	12
LV	-	-	-	0
LT	-	-	-	-
LU	30	15	39	2
HU	3	29	44	0
MT	-	-	-	-
NL	19	22	41	1
AT	18	20	57	1
PL	-	-	-	-
PT	19	34	46	3
RO	7	19	33	2
SI	21	27	43	1
SK	4	20	31	0
FI	-	-	-	-
SE	-	-	-	-
UK	18	27	20	6

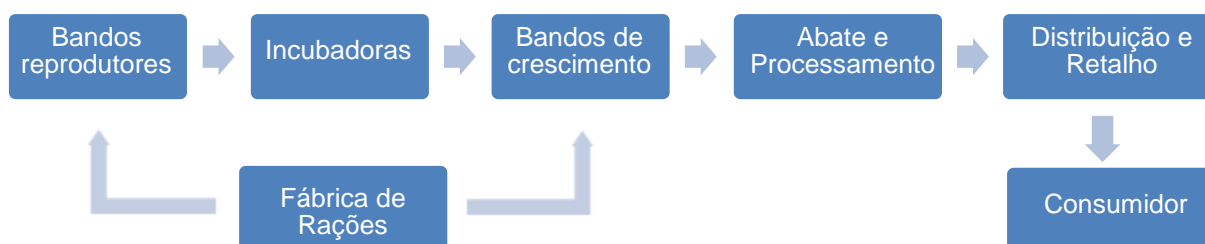
Destacado a amarelo os dados para Portugal. <sup>(1)</sup>Dados do período equivalente de 2007-8 utilizados na ausência de dados relativos a 2009. Fonte: Eurostat, Food: From farm to fork statistics (2011).

Tendo a carne de aves um considerável impacto nos actuais padrões de consumo, Portugal apresenta-se actualmente auto-suficiente na produção de frangos de carne, ovos para consumo e ovos para incubação (INE, 2011). Em Portugal, durante o ano de 2011, do total de aves abatidas e aprovadas para consumo 96,6% foram frangos de carne (INE, 2012).

### 2.2.2. Sistemas de produção

Apresentando o sector avícola um elevado grau de especialização, tecnologia e um sistema de produção integrado (Figura 2), podem definir-se dois modos principais de produção de frangos de carne - o sistema intensivo e os sistemas semiextensivos (Figura 3). Com uma maior densidade de produção, os sistemas intensivos permitem uma maior produção de carne num menor período de tempo (aproximadamente 5-6 semanas) e por uma menor unidade de área utilizada (Field, 2004). Nestes sistemas, os frangos encontram-se no interior de pavilhões, no chão, com camas secas suportadas em estrados, sendo todos os nutrientes requeridos pelas aves providenciados pela alimentação fornecida, sob a forma de alimento composto completo.

Figura 2 - Estrutura simplificada do sistema industrial integrado na produção de frangos de carne.



Fonte: Adaptado de Field e Taylor (2004).

A produção em modo semiextensivo, quando comparada com o modo intensivo, tem um maior custo associado ao maior tempo que os frangos demoram a chegar à idade de abate, pela maior área necessária e pelo maior índice de conversão alimentar destes animais. Há, no entanto, um maior valor acrescentado no produto final atribuído a aspectos relacionados com a percepção dos consumidores no referente ao ambiente, sustentabilidade, saúde e bem-estar animal, sendo este modelo muitas vezes optado por produtores direccionados a um nicho de mercado alvo, disposto a pagar mais por este tipo de produto (FAO, 2010). Vários aspectos se apresentam variáveis neste modelo de produção (semiextensivo), tais como o tipo de acesso ao exterior, o rácio entre pastagem e alimento composto, estirpes utilizadas (ver ponto 2.2.3) e a idade de abate. Estão categorizados diferentes tipos de produtos finais seguindo vários aspectos regulamentados: idade de abate, densidade, acesso ao exterior, estirpe utilizada, dimensão do bando, distância de transporte entre o local de produção e a unidade de processamento (EC, 2000).

Figura 3 - Exemplo de instalações de um sistema de produção intensivo (esquerda) e semiextensivo (direita).



Fonte: Interaves S.A.

### 2.2.3. Raças e estirpes

Podemos considerar três principais categorias de raças na produção actual, em função da sua vocação zootécnica: carne, ovos e mistas. As quatro principais classes de raças são as Americanas, Asiáticas, Inglesas e Mediterrâneas (Field, 2004). O notável trabalho de selecção genética aplicado ao longo dos últimos anos permitiu ter actualmente linhas de produção altamente especializadas e com índices produtivos notavelmente superiores à das suas antepassadas. Na sequência deste processo adoptou-se a designação de linhas ou estirpes, que resultam do cruzamento controlado entre diferentes raças (*outbreeding*) e dentro da mesma raça (*inbreeding*). O nome dado a cada estirpe é normalmente proveniente da empresa que a desenvolveu (Ross, Peterson and Hubbard, Arbor Acres, entre outros).

Tendo em conta a aptidão produtiva de cada estirpe, a escolha das mesmas deve ser efectuada em função do tipo de produção, do tipo de produto desejado pelo mercado alvo e das condições de produção, entre outras.

### 2.2.4. Alimentação e Maneio

O maneio alimentar tem um importante impacto na produção, sendo um dos factores determinantes na performance dos animais e na qualidade final da carne. O impacto económico na produção também é elevado, representando os custos com a alimentação 60% ou mais dos custos totais envolvidos (Field, 2004; FAO 2011; Louw, Schoeman & Geyse, 2011). Em 2010, 41% dos alimentos compostos produzidos em Portugal foram destinados à alimentação de aves (IACA, 2011), tendo em 2009 a quota de alimentos compostos produzidos com destino à alimentação de aves sido de 39,9%, dos quais cerca de 59% se destinaram a frangos de carne e cerca de 29% para a produção de ovos para consumo e incubação (INE, 2011).

As modernas linhas de frangos de carne, não conseguindo um controlo adequado da ingestão voluntária de alimentos para atingir as suas necessidades energéticas e

manutenção do balanço energético, obrigam a um rigoroso controlo dos parâmetros produtivos e à compreensão da influência destes na ingestão de alimento, para atingir os melhores resultados produtivos e fazer o melhor aproveitamento do potencial produtivo dos animais (Richards & Proszkowiec-Weglarz, 2007). Actualmente, as rações fornecidas são complexas misturas que incluem, de forma balanceada, todos os nutrientes que se conhecem ser necessários para a manutenção, produção máxima de ovos e carne e índices reprodutivos óptimos.

Devem ser tomadas em conta as limitações das aves no que se refere à de síntese de aminoácidos essenciais e vitaminas e capacidade de digerir celulose, atribuindo-se uma elevada importância à forma como o alimento é formulado. O balanço dos diferentes constituintes do alimento deve ser compreendido em profundidade e atendido. A ingestão de alimento é principalmente regulada pelo conteúdo energético do alimento, havendo uma necessidade de balancear os níveis energéticos e proteicos fornecidos, assegurando que um alimento com altos níveis de energia fornece também proteína suficiente para as necessidades em aminoácidos (McDonald, Edwards, Greenhalgh, & Morgan, 1995).

Os principais constituintes das formulações para frangos de carne são cereais, normalmente incorporados numa taxa que varia de 40 a 60%. A formulação deve ser adequada à idade dos animais e ao produto final desejado em termos de peso final e idade de abate, a fim de se obterem as melhores margens de lucro possíveis (ROSS, 2009a). As idades são normalmente divididas em iniciação (dos 0 aos 10 dias de idade), crescimento (até aos 24-26 dias de idade) e acabamento (a partir dos 25 dias de idade).

Em Portugal, o principal cereal utilizado na alimentação de aves é o milho (IACA, 2012) dado o seu preço, o seu elevado conteúdo em amido e o baixo teor de factores anti-nutritivos. No entanto, em algumas épocas o seu preço pode ser elevado, levando a que este possa ser muitas vezes substituído por trigo, sorgo (com baixo teor em taninos) ou cevada.

Além da componente alimentar o controle, dos factores ambientais e sanitários deve também ser alvo de um rigoroso controlo e compreensão. Apesar da ingestão de alimento ser o principal factor a influenciar o ganho de peso e o índice de conversão, é normalmente difícil diagnosticar e corrigir um problema relacionado com um baixo nível de ingestão sem que sejam revistas as práticas de manejo e saúde dos bandos, tendo estas maior probabilidade de causar problemas na ingestão de alimento que os factores dietéticos (Ferket & Gernat, 2006).

## **2.3. Suplementação enzimática na produção avícola**

### **2.3.1 História, actualidade, valor de mercado**

“As enzimas existem praticamente em todo o lado. Ocorrem naturalmente e são produzidas por todos os organismos vivos e, como catalisadores da natureza, aceleram as reacções químicas que permitem a vida, desde aos mais simples organismos unicelulares, passando por plantas e insectos até aos humanos. Sem elas o alimento não pode ser digerido.” (Bedford, 2000).

Ainda que frequentemente inconsciente, o uso de enzimas pelos Humanos tem sido verificado ao longo da história da Humanidade. Exemplos são o fabrico de queijos ou o uso de leveduras e de malte da cevada para produzir cerveja. No entanto a moderna indústria da produção de enzimas, com início no fim do século XIX, começa com a identificação e produção refinada das primeiras enzimas (Uhlir, 1998).

A produção animal não é excepção no que diz respeito ao recurso a produtos desta tecnologia, utilizando enzimas com vista a melhorar o valor nutritivo de diferentes matérias-primas, melhorar o valor nutricional do produto final e corresponder às exigências do consumidor por um produto mais barato, seguro, saudável e mais amigo do ambiente (Grunert, 2005). Apesar do seu uso ter sido considerado já na década de cinquenta, é apenas na década de oitenta que a indústria de alimentos para animais começa a compreender o valor e capacidade desta tecnologia (Bedford, 2000). Actualmente podemos resumir a aplicação de enzimas na alimentação animal, com especial destaque na avicultura e suinicultura, em cinco principais objectivos 1) libertação de fósforo através da hidrólise dos fitatos, 2) eliminação do efeito de encapsulação dos nutrientes pelas paredes celulares, conseguindo uma maior disponibilidade energética e de aminoácidos, 3) solubilização de polissacáridos não amiláceos das paredes celulares, 4) hidrólise de ligações proteína-hidrato de carbono, melhorando a disponibilidade de aminoácidos, e 5) eliminação do efeito anti-nutritivo de alguns polissacáridos não amiláceos presentes em alguns cereais (Slominski, 2011).

Em 2010 o valor de mercado global de enzimas foi de cerca de 2,5 biliões de euros, representando as enzimas destinadas à alimentação animal uma quota de 8% (Novozymes, 2011).

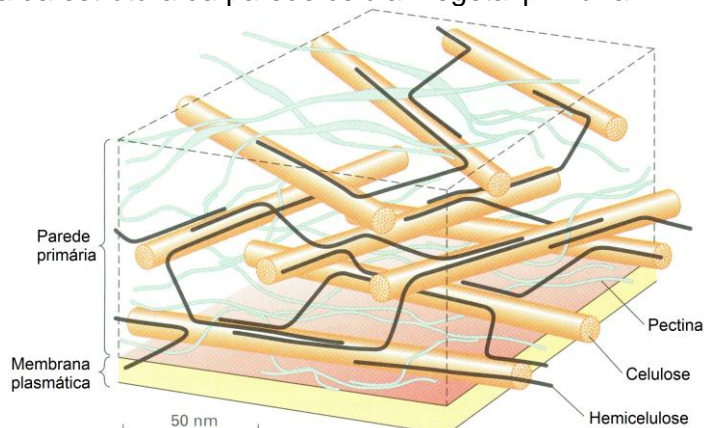
### **2.3.2 Parede das células vegetais**

A rodear as membranas citoplasmáticas das células vegetais encontramos uma complexa parede de polissacáridos que tem como principal constituinte a celulose, um dos mais abundantes e renováveis biopolímeros do planeta (Cosgrove, 2005).

Depois do alongamento da célula estar completo, o espessamento da parede celular ocorre por duas formas possíveis, 1) secreção adicional de macromoléculas para a parede celular primária ou, mais frequentemente, 2) formação de uma parede celular secundária composta

por várias camadas (Lodish, 2000). As fibras de celulose estão embebidas e ligadas a uma matriz que contém outros dois tipos de polissacáridos, hemicelulose e pectina (Figura 4).

Figura 4 - Esquema da estrutura da parede celular vegetal primária.

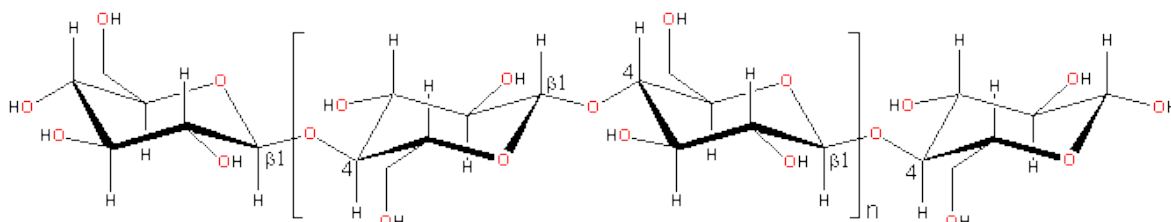


Fonte: Lodish (2000)

Cada molécula de celulose (Figura 5) consiste em pelo menos 500 resíduos de glucose ligados entre si por ligações glicosídicas  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , havendo uma rotação de  $180^\circ$  entre cada unidade de glucose e a sua precedente, que confere uma estrutura planar que é estabilizada por ligações de hidrogénio intramoleculares (Azevedo, 2005). Estas cadeias dispõem-se lado a lado, formando as microfibrilhas, as quais por sua vez se associam originando as fibrilhas de celulose que atingem diversos micrómetros de comprimento e  $3-10 \mu\text{m}$  de diâmetro e que apresentam uma estrutura cristalina ou quase cristalina, inter-espaçadas por regiões amorfas.

As hemiceluloses são grupos heterogêneos de polissacáridos que se ligam à superfície de cada fibra de celulose, efectuando a ligação destas numa complexa teia. Podem ser classificadas em diferentes classes, caracterizadas pelo tipo de açúcar que forma o seu esqueleto principal (glucose, xilose, manose), a partir do qual se formam as pontes de hidrogénio que se ligam à superfície das fibras de celulose (Lodish, 2000). As pectinas, contendo várias unidades de ácido galacturónico carregadas negativamente, são altamente hidratadas formando géis semi-rígidos na presença de cálcio. Estas ligações cruzadas entre o cálcio e as pectinas têm um papel importante na manutenção da estrutura da parede (Azevedo, 2005).

Figura 5 - Celulose, polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1 \rightarrow 4)$ .



Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycel.html>

### 2.3.2.1 Polissacáridos não amiláceos

Os polissacáridos são os principais componentes dos materiais vegetais utilizados na alimentação dos monogástricos (Williams, Geraert, Uzu, & Annison, 1997). São polímeros constituídos por monossacáridos ligados entre si por ligações glicosídicas. O mais importante, o amido, consiste de unidades de glucose ligadas por ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  4) e algumas ligações  $\alpha$  (1  $\rightarrow$  6). Noventa a noventa e cinco por cento do amido é digerido no intestino delgado por enzimas endógenas, as  $\alpha$ -amilases e as amilo-1-6- $\alpha$ -glucosidases (Gray, 1992).

Os polissacáridos não amiláceos (PNA), em inglês non-starch polysaccharides (NSP), designam todos os polissacáridos contidos nos cereais excepto o amido (McNab & Boorman, 2002). Podemos classificar os PNA em três grupos principais, 1) celulose, 2) polímeros não-celulósicos, e 3) polissacáridos pécticos (Choct, 1997). Nos PNA incluem-se também os oligossacáridos não digeridos pelas enzimas endógenas dos animais, como a estaquiose, a rafinose e a verbascose, e que não serão considerados no âmbito deste trabalho. Os principais PNA encontrados nos alimentos utilizados na alimentação animal, assim como os principais factores e mecanismos anti-nutricionais são de seguida indicados. A ausência de enzimas capazes de clivar os compostos polisacarídicos com ligações  $\beta$  faz com que os mamíferos e aves sejam incapazes de degradar estas moléculas (Bedford & Schulze, 1998). Para a digestão e utilização da energia contida nos PNA, os animais estão dependentes da fermentação microbiana que ocorre no lumen do seu tracto gastro-intestinal (Lange, 2000).

O conteúdo de PNA de diferentes cereais (Quadro 2) varia conforme o próprio cereal, a espécie e, ainda na mesma espécie, conforme o genótipo e o cultivar (Knudsen, 2001).

Quadro 2 - Constituição de PNA solúveis, insolúveis e totais, e concentração dos principais PNA na matéria seca (% MS).

Ingrediente	PNA Solúveis	PNA Insolúveis	Total PNA	Principal PNA e Concentração (% MS)
Trigo	2,4%	9,0%	11,4%	Arabinoxilano (6,05%) $\beta$ -D-Glucano (0,5%)
Centeio	4,6%	8,6%	13,2%	Arabinoxilano (8,9%) $\beta$ -D-Glucano (1,2%)
Cevada	4,5%	12,2%	16,7%	$\beta$ -D-Glucano (7,6%) Arabinoxilano (3,3%)
Sorgo	nd	nd	nd	Arabinoxilano (2,8%) $\beta$ -D-Glucano (0,1%)
Milho	nd	nd	nd	Arabinoxilano (4,2%) $\beta$ -D-Glucano (0,1%)
Tritical	nd	nd	nd	Arabinoxilano (7,0%) $\beta$ -D-Glucano (0,7%)

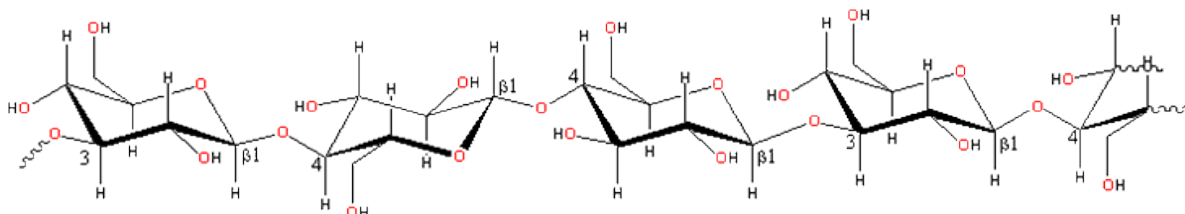
Nd: dados não disponíveis. Fonte: Lange (2000)



Também os factores ambientais antes da colheita, assim como o armazenamento e processamento pós colheita têm influência no conteúdo de PNA dos cereais (Mohammed, 1995; Wootton, 1995). Verificou-se que o conteúdo total de  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucanos na cevada não está tão relacionado com o tipo de cevada (dística ou hexástica) mas mais com o facto de ser proveniente de uma cultura de Verão ou de Inverno (Williams *et al.*, 1997).

Os  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucanos ( $\beta$ -glucanos) consistem de uma cadeia linear de unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$  (Figura 6), que representam, respectivamente, 30% e 70% das ligações presentes (Choct, 1997). A incorporação das ligações  $\beta(1\rightarrow3)$  quebra a estrutura normal das cadeias  $\beta(1\rightarrow4)$ , evitando um alinhamento das moléculas, e sua ligação por pontes de hidrogénio, tornando o polímero mais solúvel.

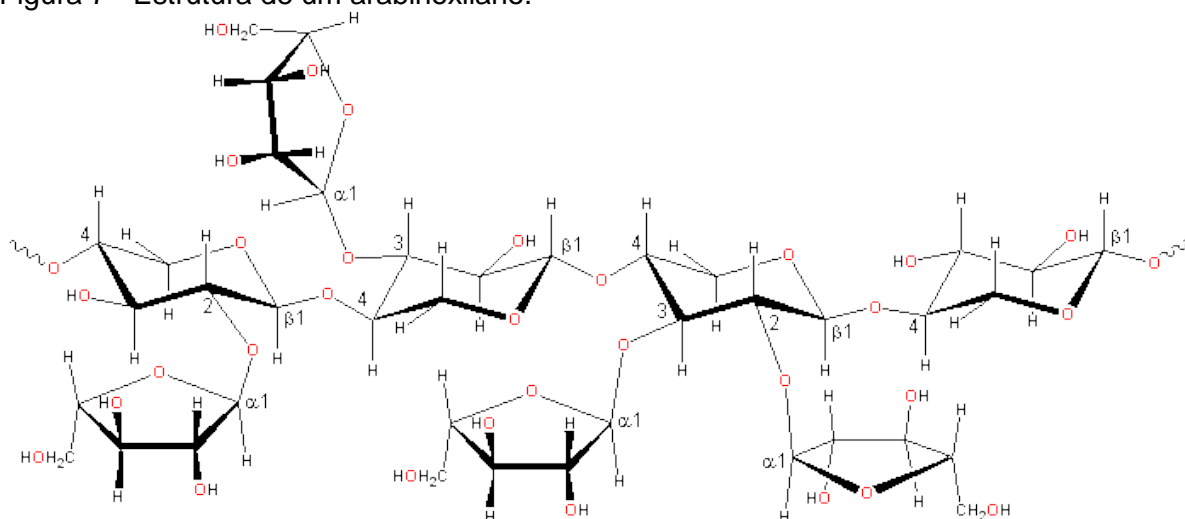
Figura 6 - Estrutura de um  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucano ( $\beta$ -glucano), polímero composto por moléculas de glucose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$ .



Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hygly.html>

Os arabinoxilanos (Figura 7), também designados por pentosanos, são compostos predominantemente por duas pentoses, arabinose e xilose, e a sua estrutura molecular consiste de um esqueleto linear de xilose com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  com arabinoses ligadas aos carbonos 3 e 4 das moléculas de xilose (Choct M. , 1997).

Figura 7 - Estrutura de um arabinoxilano.



Fonte: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyara.html>

Os PNA podem ser solúveis ou insolúveis. Apesar dos PNA solúveis terem um maior potencial para serem digeridos pelas aves, estes são conhecidos por serem responsáveis

pelas quebras na energia metabolizável aparente e da digestibilidade das proteínas dos alimentos e consequente diminuição na performance dos animais (Choct & Annison, 1990; Williams *et al.*, 1997; Knudsen, 2001).

Bedford e Schulze (1998) sugerem dois mecanismos principais para os efeitos anti-nutricionais dos PNA solúveis em monogástricos. O encapsulamento do amido e proteínas pelos PNA da parece celular e o aumento da viscosidade da digesta, que leva a uma menor difusão das enzimas digestivas nesta e, consequentemente, menor digestibilidade de todos os constituintes alimentares.

#### **2.3.2.1.1 PNA solúveis na alimentação de aves**

É sabido que a natureza viscosa dos polissacáridos desempenha um importante papel na actividade anti-nutritiva destes (Choct & Annison, 1990). Aquando da adição de diferentes níveis de PNA a dietas de frangos de carne verificou-se um aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e diminuição dos índices de crescimento (Lavinia *et al.*, 2010; Amerah, Ravindran, Lentle & Thomas, 2008). As principais propriedades físico-químicas com influência na alteração da viscosidade da digesta pelos PNA são a capacidade de hidratação e a viscosidade (Knudsen, 2001). É conhecido que a maioria dos PNA solúveis forma soluções viscosas quando dissolvidos (Morris, 1992). A capacidade de hidratação reflecte-se na capacidade da partícula fibrosa aumentar de volume (intumescimento), na capacidade de retenção de água e na capacidade de ligação à água, que traduzem a capacidade de uma fonte fibrosa incorporar água na sua matriz. A estimulação de secreção de sucos digestivos associada à presença de PNA contribui também para a elevação da viscosidade da digesta, por aumento dos fluidos presentes (Caprita, Caprita, & Cretescu, 2011).

A presença de PNA solúveis e o aumento da viscosidade da digesta levam a alterações na fisiologia e microbiota intestinais (Angkanaporn *et al.*, 1994). Uma passagem mais lenta da digesta com uma baixa tensão de oxigénio cria um ambiente relativamente estável para o desenvolvimento de microrganismos fermentadores, tendo sido verificado um aumento significativo na fermentação no intestino delgado aquando da adição de PNA solúveis em dietas para frangos (Choct *et al.*, 1996). Apesar da possibilidade de formação de ácidos gordos voláteis parecer favorável, as drásticas mudanças no ecossistema intestinal levam a uma diminuição da digestão de nutrientes e menores desempenhos produtivos (Choct, Dersjant-Li, McLeish & Peisker, 2010).

Verifica-se, também, uma estimulação da produção enzimática, reflectida num aumento das dimensões do pâncreas, sugerindo que para tal também contribua o aumento do tempo de esvaziamento gástrico (Lin, Shih & Hsu, 2010). Foi sugerida, também, uma estimulação da produção de ácidos biliares, sendo verificado um aumento da perda destes nas fezes de ratos alimentados com dietas ricas em PNA (Ide, Horii, Kawashima & Yamamoto, 1989).

Como consequência, tem sido proposto que a desconjugação de ácidos biliares por microrganismos contribui também para a alteração do microbiota intestinal atribuído aos PNA (Hübener, Vahjen & Simon, 2002). Estes factores, assim como a verificação da ligação de alguns PNA aos ácidos biliares, contribuem para uma deficiente digestão dos lípidos, sendo um factor importante na diminuição da energia metabolizável aparente dos alimentos, atribuída aos PNA (Lavinia *et al.*, 2010).

O impacto dos PNA solúveis na dieta está também documentado como factor predisponente para a ocorrência de outros problemas ao nível de saúde e sanidade animal, tal como a enterite necrótica (Kaldhusdal & Hofshagen, 1992), tendo sido verificado uma grande redução do agente causal (*Clostridium perfringens*) em animais suplementados com enzimas (Saleem *et al.*, 2010). O elevado nível de PNA na dieta está também associado com o problema das camas húmidas e consequente desenvolvimento de parasitas, como as coccídeas e os fungos (Bharti, 2008).

#### **2.3.2.1.2 PNA Insolúveis**

Uma referência deve ser efectuada à componente insolúvel dos polissacáridos não amiláceos. Apesar de atribuída inicialmente uma função diluidora de nutrientes, sem influência na digestão e absorção destes (Edwards, 1995), tem-se vindo a verificar que a inclusão, em quantidades moderadas nas dietas, mostra efeitos favoráveis, com destaque na melhoria de performance nas idades mais precoces (Svihus & Hetland, 2001; Hetland, Svihus & Choct, 2005). A proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento levou ao recurso a aditivos naturais no combate ao aumento da incidência de problemas entéricos dos animais (Mateos, Jiménez-Moreno, Serrano, & Lázaro, 2012), tendo esta componente insolúvel mostrado resultados promissores como substituto dos compostos anteriormente utilizados (Mateos, Lazaro & Garcia, 2002; Montagne, 2003).

Os principais efeitos benéficos sugeridos são uma melhoria do tempo de trânsito intestinal, melhor mobilidade intestinal, melhor contacto da digesta com as enzimas endógenas e um aumento da altura das vilosidades intestinais (Sacrainie *et al.*, 2012). É apontado como factor de maior relevância o maior tempo de permanência da digesta na moela, levando a uma diminuição da dimensão das partículas, uma melhor regulação da motilidade intestinal, do controlo do fluxo da digesta e dos refluxos gastrointestinais, aumento das secreções digestivas e sincronização da digestão e absorção (Mateos, Jiménez-Moreno, Serrano & Lázaro, 2012). Os principais pontos de investigação na incorporação de PNA insolúveis actualmente são 1) a velocidade de passagem da digesta e dimensão dos órgãos, 2) relação com a secreção de ácido clorídrico, sais biliares, enzimas digestivas e absorção de nutrientes, 3) ingestão voluntária de alimento e crescimento, 4) saúde intestinal, integridade da mucosa e crescimento microbiano.

### **2.3.3 Enzimas**

#### **2.3.3.1 Enzimas activas em hidratos de carbono (CAZy)**

A extensa variedade de hidratos de carbono é apenas equiparada à enorme multiplicidade de enzimas envolvidas no seu metabolismo. A necessidade de uma nomenclatura prática, precisa e actualizada para fazer face aos novos conhecimentos adquiridos com o decorrer da investigação actual é uma necessidade. Um resumo da evolução da classificação de diferentes enzimas, com destaque para as hidrolases glicosídicas é, de seguida, apresentado.

O sistema apresentado pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMC – International Union of Biochemistry and Molecular Biology) é expresso pelo número EC atribuído a cada enzima. Este número caracteriza a classe (1. oxido-redutase; 2. transferases; 3. hidrolases; 4. liases; 5. isomerases; e 6. ligases), sub-classe, ligação alvo da enzima, e substrato. Para as hidrolases glicosídicas (EC 3.2.1.x), os três primeiros dígitos indicam que hidrolisam ligações O-glicósido, sendo que o x indica o substrato. Esta designação levanta, no entanto, questões uma vez que não reflecte as características destas enzimas, a estereoquímica dos substratos e há uma lacuna para a classificação de enzimas que actuam em vários substratos (Henrissat, 1991).

Henrissat (1991) propõe um sistema de classificação para as hidrolases glicosídicas onde estas são classificadas em famílias com base na similaridade partilhada ao nível da sua sequência primária. A classificação em famílias tem por base a verificação da conservação do mecanismo de acção, dos resíduos catalíticos e da estrutura tridimensional (Henrissat & Davies, 1997). A aquisição de novos conhecimentos levou também ao agrupamento das famílias em superfamílias (também designadas por clãs) com base na estrutura tridimensional e aspectos mecânicos comuns (Davies & Henrissat, 2002).

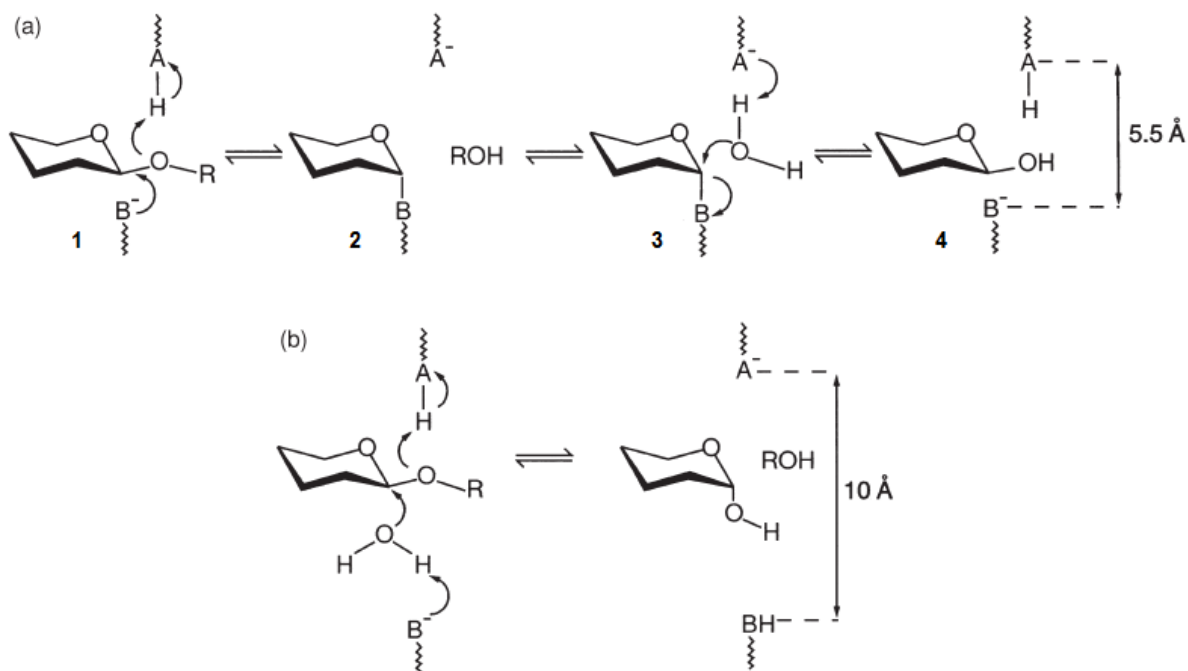
Em 1998 é proposta uma terminologia para a denominação de hidrolases glicosídicas baseada no substrato alvo da enzima, correspondendo as três primeiras letras ao substrato, seguidas do número da família e terminando numa letra maiúscula que corresponde à ordem em que o módulo catalítico foi descrito (Henrissat, Teerib, & Warrenc, 1998). A título de exemplo, a primeira hidrolase glicosídica descrita pertencente à família 8, cujo substrato preferencial é a celulose será denominada Cel8A.

As hidrolases glicosídicas estão actualmente classificadas em 130 famílias (Março 2012, Base de dados CAZy) e a extensa lista pode ser consultada em <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (Cantarel, Coutinho, Rancurel, Bernard, Lombard, & Henrissat, 2009).

### 2.3.3.2 Mecanismos de acção das hidrolases glicosídicas

A hidrólise enzimática das ligações glicosídicas ocorre através de uma reacção ácido-base que pode levar a uma inversão ou retenção da configuração do carbono anomérico, conforme a família da enzima. As reacções de retenção de configuração (Figura 8a) utilizam um mecanismo de deslocação duplo, envolvendo a formação e subsequente hidrólise de um intermediário covalente, enquanto que a reacção de inversão de configuração (Figura 8b) é efectuada através de um mecanismo de deslocação único.

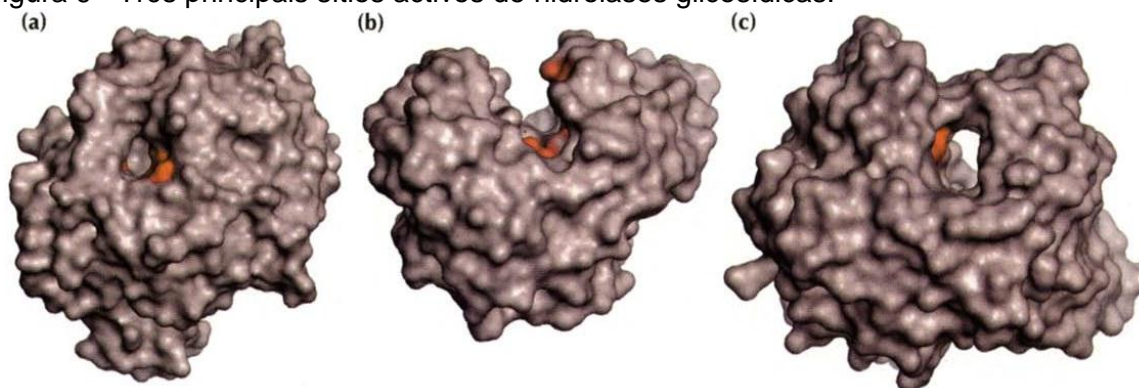
Figura 8 - Mecanismo de retenção (a) e de inversão (b) de configuração.



**(a)** Mecanismo de retenção onde (1) o oxigénio glicosídico é protonado pelo resíduo ácido (A-H) e o resíduo alcalino (B-) fornece assistência para a saída da aglicona (2). O produto é hidrolisado por uma molécula de água (3) e esta segunda substituição nucleofílica no carbono anomérico gera um produto com uma configuração estereoquímica igual ao substrato (4). **(b)** Mecanismo de inversão onde a protonação do oxigénio glicosídico e a partida da aglicona são acompanhadas por um ataque concomitante de uma molécula de água que é activada pelo resíduo alcalino (B-). Esta substituição nucleofílica resulta num produto com uma configuração estereoquímica oposta à do substrato. Fonte: Davies & Henrissat (1995).

Independentemente do mecanismo de acção, as enzimas podem também ser classificadas como exo ou endoenzimas, tendo esta classificação tradução na topologia do sítio activo da enzima (Figura 9).

Figura 9 - Três principais sítios activos de hidrolases glicosídicas.



Os resíduos catalíticos (com coloração vermelha) são normalmente encontrados em três locais, denominados de (a) bolso, (b) fenda e (c) túnel. Fonte: Davies & Henrissat (1995).

As enzimas com a topologia em bolsa atacam as cadeias polissacarídicas nas extremidades não-redutoras, estando melhor adaptadas para substratos com bastantes terminações disponíveis. Estas são designadas *exo*-enzimas (e.g. *exo*-glucanases), assim como as enzimas que apresentam a topologia do sítio activo em túnel, necessitando de uma terminação disponível na cadeia polissacarídica para que esta entre no túnel onde se efectuam ligações à cadeia, criando melhores condições para que a enzima hidrolise sucessivas ligações seguidas ao longo do polímero (Davies & Henrissat, 1995). A estrutura "aberta" em fenda permite a ligação a locais aleatórios do polímero, sendo as enzimas designadas por *endo*-enzimas (e.g. *endo*-glucanases). A acção das *endo*-glucanases, ao criarem terminações livres ao longo do polímero, permitem a acção posterior de *exo*-glucanases.

#### 2.3.3.3 Módulos não catalíticos

Vem de longa data a sugestão da presença e colaboração de componentes proteicos não catalíticos aquando da degradação enzimática da celulose cristalina (Reese, Siu, & Levinson, 1950). Mais tarde, foram identificados na maioria das hidrolases glicosídicas de polissacáridos módulos não catalíticos, que apresentam um funcionamento independente do domínio catalítico, cuja principal função é manter uma elevada concentração de enzima junto do substrato (Warren, 1996). Esta função vem melhorar a acção das hidrolases glicosídicas que mostram, muitas vezes, uma relativa ineficiência no ataque de certos polissacáridos, em parte devido à inacessibilidade das ligações glicosídicas alvo (Boraston, Bolam, Gilbert, & Davies, 2004).

As primeiras descrições detalhadas destes módulos surgem na década de 80 (Van Tilbeurth, Tomme, Claeyssens & Bhikhabhai, 1986; Gilkes, Warren, Miller & Kilburn, 1988; Tomme *et al.*, 1988; Gilbert *et al.*, 1988), sendo, então, adoptada a designação de domínios de ligação à celulose (em inglês Cellulose Binding Domains) uma vez que todos eles apresentavam especificidade para a celulose. Esta designação persistiu até 1999 onde a evidente presença de módulos não catalíticos com afinidade para outros hidratos de

carbono além da celulose leva à adopção da designação de módulos de ligação a hidratos de carbono (em inglês carbohydrate-binding modules) (Boraston *et al.*, 2004).

Um módulo de ligação a hidratos de carbono (sendo neste trabalho adoptada a sigla CBM do inglês Carbohydrate-Binding Module) pode ser definido como uma sequência de aminoácidos contígua, dentro de uma enzima com actividade sobre hidratos de carbono, tendo uma conformação e actuação independentes e actividade na ligação a hidratos de carbono (Shoseyov, Shani & Levy, 2006; Fontes e Gilbert, 2010). Os CBM contêm de 30 até cerca de 200 aminoácidos e existem como um simples, duplo, ou triplo domínio dentro de uma proteína. A ligação à proteína pode ser feita através da terminação carboxílica (C-), aminada (N-), ou estarem ocasionalmente posicionados no centro da cadeia polipeptídica (Shoseyov *et al.*, 2006). A principal função do CBM é o reconhecimento e ligação específica a um substrato, melhorando a hidrólise de substratos insolúveis pela promoção da aproximação entre o domínio catalítico e o substrato (Guillén, Sánchez & Rodríguez-Sanoja, 2010). A ligação de um CBM a um substrato cristalino leva, em alguns casos, a uma desorganização dos polissacáridos e a um melhoramento da disponibilidade do substrato (Gao *et al.*, 2001).

De forma semelhante às hidrolases glicosídicas, os CBM são actualmente classificados em famílias, com base na sequência de aminoácidos, especificidade de ligação e estrutura (Shoseyov *et al.*, 2006), estando actualmente classificados em 64 famílias (Março de 2012, Base de dados CAZy). A extensa lista, e detalhes sobre cada família, pode ser consultada em <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html> (Cantarel *et al.*, 2009).

É também efectuada uma classificação dos CBM com base na topologia do local de ligação aos hidratos de carbono e consequente afinidade para diferentes tipos de ligando (Boraston *et al.*, 2004). Os CBM designados de tipo A apresentam no local de ligação uma superfície lisa ou em plataforma, hidrofóbica e interagem com as superfícies lisas de polissacáridos cristalinos, mostrando pouca ou nenhuma afinidade para substratos solúveis (Hashimoto, 2006). Os CBM de tipo B ligam-se a celulose ou xilano amorfo, interagindo com cadeias polissacarídicas livres (Boraston *et al.*, 2004). O local activo tem forma de fenda dada a orientação das cadeias aromáticas laterais que formam plataformas “torcidas” ou em “sandes”. A orientação dos aminoácidos é determinante na especificidade destes CBM (Hashimoto, 2006). Apresentam ainda vários locais secundários de ligação que permitem acomodar várias unidades individuais de açúcar do polímero a que se ligam. Os CBM de tipo C apresentam afinidade óptima apenas a mono-, di-, ou trissacarídeos devido a restrições estereoquímicas no local de ligação (Hashimoto, 2006).

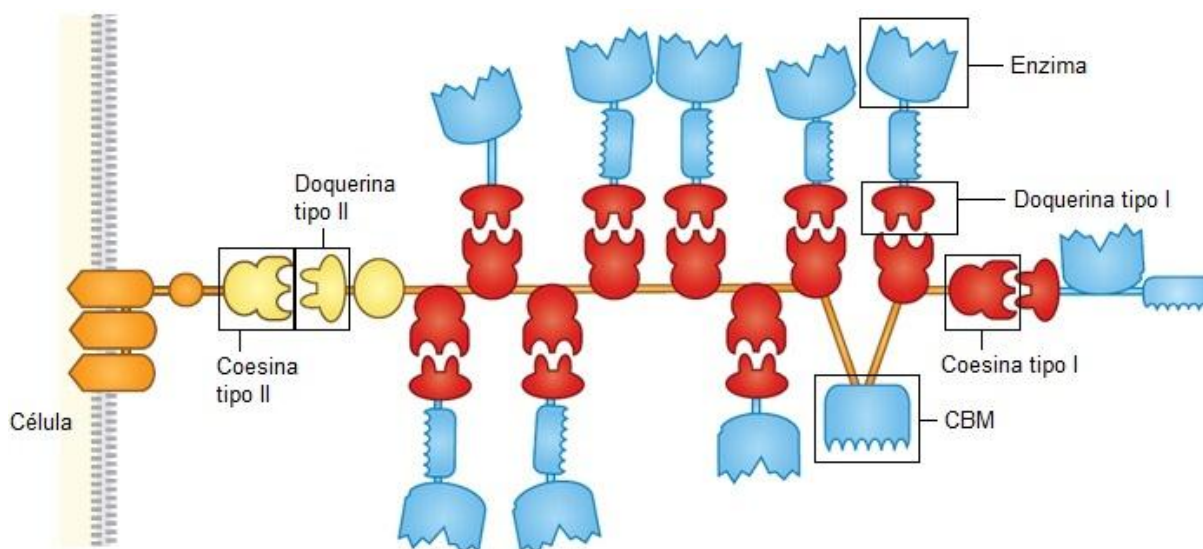
Vários trabalhos recentes reportam um melhoramento da eficiência de celulasas e xilanasas recombinantes aquando da presença de um CBM na suplementação de dietas à base de cereais para frangos de carne (Fontes *et al.*, 2004; Guerreiro *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008).

#### 2.3.3.4 O Celulosoma

Os polissacáridos da parede celular vegetal representam um dos principais reservatórios de carbono e energia nas plantas (Cosgrove, 2005). No entanto, apenas um número restrito de microrganismos tem capacidade de desconstruir estas estruturas. Dentro deste grupo, o repertório de enzimas utilizado pelos microrganismos aeróbios difere consideravelmente do apresentado pelos anaeróbios, sendo as celulasas e hemicelulasas destes últimos, talvez pelas maiores pressões selectivas impostas, normalmente incorporados num complexo multienzimático denominado celulosoma (Fontes & Gilbert, 2010).

Os celulosomas são vistos como verdadeiras nanomáquinas de elevada eficiência desenhadas para decompor os complexos hidratos de carbono da parede celular vegetal (Fontes & Gilbert, 2010), ou máquinas multienzimáticas para degradação dos polissacáridos da parede celular vegetal (Bayer, Belaich, Shoham & Lamed, 2004). Desde o início da década de 80, com a primeira identificação e caracterização de um celulosoma (Lamed, Setter, Kenig & Bayer, 1983), os conhecimentos sobre a estrutura, funcionamento, especificidades e características têm notado um crescimento exponencial, assim como uma enorme multiplicidade de diferentes aplicações potenciais surgem no horizonte.

Figura 10 - Esquema simplificado de um celulosoma do *Clostridium thermocellum*.



As coesinas e doquerinas do tipo I têm um papel estrutural no celulosoma na ligação dos módulos catalíticos enquanto as do tipo II actuam na ancoragem da estrutura à superfície celular. Fonte: Fontes & Gilbert (2010).

A degradação de celulose cristalina é favorecida pela intervenção simultânea ou sequencial de numerosas celulasas, numa colaboração sinérgica, cuja incorporação colectiva no celulosoma torna o processo mais fácil (Bayer *et al.*, 2004). A base estrutural do celulosoma (Figura 10) é denominada *escafoldina (scaffoldin)* (Bayer & Lamed, 2006) numa forma de representar a sua estrutura tipo andaime (scaffolding em inglês) onde se encontram motivos repetidos, sob a forma de sub-unidades que podem conter coesinas, doquerinas ou um



CBM (Bayer & Lamed, 2006). As coesinas são módulos com cerca de 150 resíduos que se apresentam normalmente repetidos em tandem dentro das sub-unidades estruturais (Fontes & Gilbert, 2010). Neste seguimento encontramos módulos complementares às coesinas, aos quais estas se ligam especificamente, nas celulasas e hemicelulasas celulosomais, as doquerinas. As doquerinas contêm cerca de 70 aminoácidos e contêm dois segmentos duplicados, cada um com cerca de 22 resíduos. A interacção coesina-doquerina faz uma mediação da integração das enzimas no complexo celulosomal e tem uma elevada contribuição para a natureza selectiva e estável deste (Bayer *et al.*, 2004). As sequências amino acídicas das coesinas e doquerinas são muito conservadas dentro de cada uma das espécies que as produzem, não havendo especificidade no reconhecimento coesina-doquerina, o que sugere que os complexos celulosomais possam conter um variado repertório de módulos catalíticos, apenas influenciado pela indução de genes específicos pelos produtos da hidrólise dos polímeros da parede celular (Fontes & Gilbert, 2010).

A presença de uma doquerina de tipo II na terminação C da unidade estrutural do celulosoma permite a ancoragem deste a coesinas tipo II presentes em proteínas da superfície celular (Leibovitz & Béguin, 1996). A ausência de interacção entre coesinas/doquerinas do tipo I e tipo II permite uma distinção clara entre o mecanismo estrutural do celulosoma e o mecanismo de ligação à superfície celular (Leibovitz & Béguin, 1996). No entanto, excepto no celulosoma do *C. thermocellum* onde ocorre este sistema de ancoragem, não há um mecanismo molecular claro que explique a ligação de outros celulosomas de outras espécies à superfície celular (Fontes & Gilbert, 2010).

O celulosoma do *C. thermocellum* é um dos melhores caracterizados, mostrando também uma das mais altas taxas de hidrólise de celulose, uma elevada actividade para a celulose cristalina e é constituído por 72 enzimas celulosomais (Fontes & Gilbert, 2010).

### 3. Objectivos

Este trabalho propõem-se esclarecer algumas questões relativas à avaliação *in vivo* da eficácia de celulasas recombinantes, na suplementação de dietas à base de cevada para frangos de carne, nomeadamente:

- Avaliação da dosagem enzimática de uma mistura comercial com vista à utilização de dosagens menores de enzimas, evitando uma saturação destas junto dos substratos, para uma melhor comparação das suas actividades *in vivo*.
- Comparação entre duas estruturas celulosomais, desenhadas no Laboratório de Nutrição da Faculdade de Medicina Veterinária (UTL), sendo feita a avaliação do aumento do número de coesinas de um celulosoma do *Clostridium thermocellum* e a eficiência na degradação de polissacáridos não amiláceos solúveis.
- Avaliação preliminar de factores de inibição de celulasas na cevada e do efeito da presença de um substrato insolúvel (celulose) na actividade da Cel8A sobre os  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucanos.

## **4. Material e métodos**

### **4.1 Procedimentos laboratoriais**

#### **4.1.1 Procedimentos gerais**

Materiais de plástico e vidro, soluções e meios de cultura de uso geral foram esterilizados em autoclave (Amaro 2000, Modelo 5510), a 120 °C durante 20 minutos à pressão de 1 kg/cm<sup>2</sup>. Para centrifugação de volumes iguais ou inferiores a 2 ml foram utilizadas as microcentrífugas Eppendorf 5415E e Eppendorf 5414D (Eppendorf™). Para volumes superiores 15 ml foi utilizada a centrífuga Beckman Coulter™ Avanti J-25I. O tempo, temperatura e velocidade de centrifugação são referidos especificamente para cada protocolo. As absorvências foram registadas num espectrofotómetro Ultrospec 3100 Pro da Amersham Biosciences, sendo o comprimento de onda utilizado indicado para cada protocolo. As pesagens foram efectuadas com recurso às balanças Sartorius Analytic A210P para pesos inferiores a 5 g, Acculab Atilon ATL-623 (Sartorius Group) para pesos inferiores a 620 g, e Mettler Toledo BBK422-15LA (Mettler Toledo) para pesos inferiores a 4 kg. Os reagentes utilizados encontram-se listados no Anexo I.

#### **4.1.2 Produção de enzimas recombinantes**

##### **4.1.2.1 Transformação de células competentes**

O ADN dos dois constructos utilizados está contido em vectores pET-21a-d(+) (#69740-3, Novagen, EUA). O vector pET21a possibilita a produção de proteínas recombinantes contendo uma sequência de seis histidinas (His<sub>6</sub>-Tag®). Este marcador vai permitir a posterior purificação das proteínas por cromatografia de afinidade em colunas contendo níquel (ver 4.1.2.3). Contém ainda o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, sendo este utilizado para selecção das células de *Escherichia coli* transformadas. As células competentes utilizadas foram *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, EUA).

Para a transformação das células competentes de *E. coli*, misturam-se 3 µl de ADN (1,5 µg) com 200 µl de células competentes e incuba-se a mistura em gelo durante 30 minutos. Procede-se, em seguida, a um choque térmico em banho de água a 42 °C, durante 40 segundos. As células são colocadas novamente em gelo durante 5 minutos. Adiciona-se 800 µL de meio SOC pré-aquecido (Anexo II) e incubam-se as células durante 1 hora a 37 °C na incubadora orbital Gallenkam (Millward-Sadler *et al.*, 1995) a 220 rotações por minuto (rpm). De seguida centrifugam-se as células (4.1.1) durante 1 minuto, a 100x g, descartando-se 800 µl de sobrenadante. É efectuada sementeira por espalhamento dos restantes 200 µl em placas de meio LB (Anexo II) com ampicilina (100 µg/ml) que são colocadas a incubar durante 16h a 37 °C em estufa (Mettmert Modell 500).

#### 4.1.2.2 Hiper-expressão de proteínas recombinantes

Foi utilizado um meio de auto-indução (LBE) que usa como agente indutor a lactose, que activa o promotor pBAD da ARN polimerase T7 da *Escherichia coli* BL21(DE3) (Studier, 2005). As células de *E. coli* recombinantes foram então distribuídas em meio LBE (Anexo II) com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas durante 16 h em agitador orbital a 150 rpm, a 30 °C.

#### 4.1.2.3 Purificação de proteínas

Após a indução da expressão as células foram recolhidas por centrifugação a 4°C, durante 10 minutos e a 2300x g, utilizando o rotor Avanti JÁ-14 (4.1.1), sendo o sedimento celular ressuspenso em cerca de 2-3% do volume original em solução-tampão 10 mM imidazol (10 mM imidazol, 50 mM NaHepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). As células foram de seguida desintegradas num ultrasonicador (Bandelin Sonopuls HD 2070) em 3 picos, com uma amplitude de 4 a 8 micra, 0,7 ciclos por segundo, durante 30 segundos cada e a 0 °C, separados por igual período de repouso. O extracto proteico solúvel foi então recuperado por centrifugação, a 16000x g, no rotor JA 25.50, durante 30 minutos, a 4°C e depois filtrado através de um filtro de 0,45 µm (Life Sciences) acoplado a uma seringa de 10 cm<sup>3</sup>.

Para a purificação das proteínas foram utilizadas colunas His.Trap™ (Amersham Biosciences) e o protocolo utilizado foi o seguinte:

Com recurso a uma bomba peristáltica (Amersham Biosciences) é efectuada a lavagem da coluna de cromatografia de 5 ml His.Trap™ com 15 ml de água bidestilada. A coluna é então carregada com 5 ml de sulfato de níquel (0,1 mol/l) e novamente lavada com 10 ml de água bidestilada. Antes de passar a solução contendo a proteína a coluna é equilibrada com 25 ml de tampão 10 mM imidazol (10 mM imidazol, 50 mM NaHepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>). Foi depois passada na coluna a solução contendo a proteína a purificar. Neste passo, a proteína recombinante contendo 6 histidinas fica retida na coluna uma vez que o anel de histidinas apresenta forte afinidade para os iões de níquel presentes na coluna. De seguida foi efectuada uma primeira lavagem com 100 ml de tampão 10 mM imidazol (10 mM imidazol, 50 mM NaHepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>), promovendo a saída de todas as proteínas que não tenham interacção específica com o níquel presente na coluna. Por fim, a proteína recombinante foi recolhida em 15 ml de uma solução de eluição, tampão 300 mM imidazol (300 mM imidazol, 60 mM NaHepes, 1 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>), que promove o desprendimento da proteína dos iões de níquel por competição.

Uma amostra do extracto purificado foi colhida para avaliação do grau de pureza, presença de contaminações e correcta expressão dos constituintes desejados. Para tal foi utilizada uma técnica de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Esta baseia-se na passagem das proteínas pelos poros resultantes da polimerização de monómeros de acrilamida. As proteínas são desnaturadas principalmente pela acção do SDS (dodecilsulfado de sódio), adquirindo todas a mesma carga e, ao correrem num campo eléctrico constante, podem ser

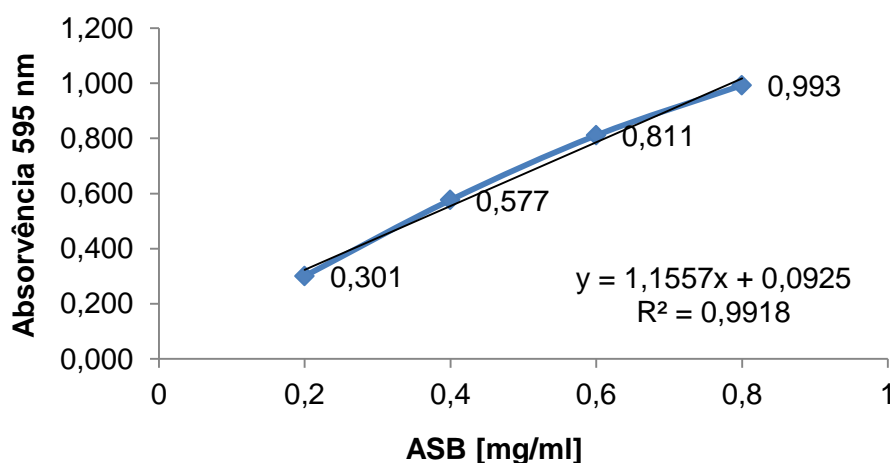
separadas em função da sua massa molecular. Foi utilizado um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14% (ver Anexo II) e o marcador de massa molecular Low Molecular Weight (LMW) Protein Marker (#MB0820, NZYTech, Portugal). Após a corrida o gel foi corado durante 15 minutos em solução corante de Azul Brilhante de Coomassie (Sigma) e de seguida as bandas reveladas por eliminação do corante não fixado por imersão do gel numa solução descorante (Anexo II). Os géis foram fotografados no Image Master VDS (Pharmacia-Biotech).

#### 4.1.2.4 Determinação da concentração de proteína de uma solução

Para a determinação da concentração de proteína nas soluções obtidas foi utilizado o método de Bradford (Bradford, 1976). Neste método há a produção de uma coloração azul na presença de proteínas com uma intensidade proporcional à quantidade de proteína presente. Esta mudança de coloração pode ser quantificada pela absorvência da luz a 595 nm. As absorvências têm que estar contidas dentro dos parâmetros de uma curva-padrão (Figura 11) construída pela relação entre concentrações crescentes de albumina sérica bovina (ASB) diluídas em água destilada e as respectivas absorvências lidas no espectrofotómetro a 595 nm.

Todas as amostras foram constituídas na seguinte proporção: 1,5 ml de reagente de Bradford (Azul Brilhante de G dissolvido em ácido fosfórico e metanol, Sigma B 6916) diluído 1:5 em água destilada e 30 µl da solução proteica a quantificar.

Figura 11 - Exemplo de curva-padrão da concentração proteica de uma solução de albumina sérica bovina (ASB).



Foram utilizadas soluções de ASB em concentrações crescentes de 0,2 a 0,8 mg/ml diluídas em água destilada, tratadas com reagente de Bradford diluído 1:5 e as respectivas absorvências registadas a 595nm.

#### 4.1.3 Determinação da actividade enzimática

##### 4.1.3.1 Ensaios de actividade enzimática

O método descrito por Miller (1959) permite determinar a quantidade de açúcares redutores libertados nas reacções enzimáticas em que há degradação de hidratos de carbono. O uso do ácido 3,5-dinitrosalicílico foi introduzido por Sumner (1921) para quantificação de açúcares redutores presentes na urina. Neste método o ácido 3,5-dinitrosalicílico é reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico pela presença de açúcares redutores, havendo um aumento da absorvência a 575 nm. A reacção enzimática é interrompida pela adição concomitante de hidróxido de sódio (Bailey, 1988).

As reacções de hidrólise catalisadas pelas enzimas foram realizadas num volume total de 600 µl, contendo a solução/suspensão com o substrato e a solução enzimática a testar, a temperatura constante e durante um tempo controlado. São, então, adicionados 600 µl da solução DNSA (ver Quadro 3) que promovem a paragem da reacção ao mesmo tempo que contém o ácido 3,5-dinitrosalicílico que será reduzido por açúcares formados durante a reacção enzimática.

Quadro 3 - Solução DNSA.

Constituinte	Quantidade
Ácido 3,5-Dinitrosalicílico	1% (p/v)
Fenol	0,2% (p/v)
Hidróxido de sódio	1% (p/v)
Sulfito de sódio	0,05% (p/v)
Solução glucose 20% (p/v)	0,2% (v/v)

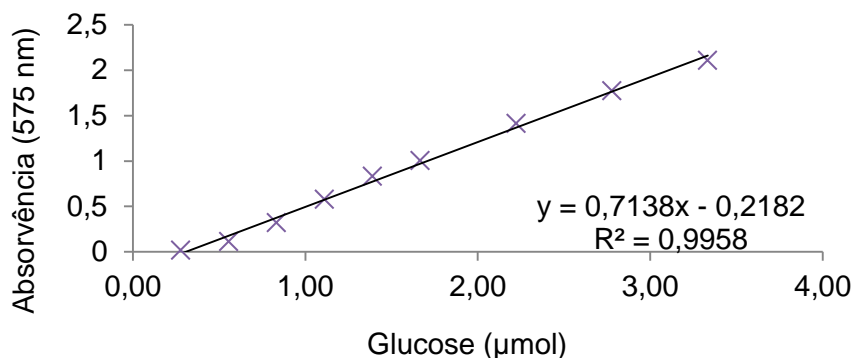
Constituintes dissolvidos em água destilada. O protocolo de preparação pode ser consultado no Anexo II.

Após adição da solução DNSA é efectuada uma incubação em banho-maria fervente durante 15 minutos, seguindo-se um arrefecimento em gelo durante 5 minutos e, por fim, uma centrifugação durante 2 minutos, a 4 °C, a 16000x g (4.1.1).

Os teores em açúcares redutores libertados foram calculados por comparação das absorvências obtidas a 575 nm com os valores de absorvência de concentrações conhecidas do respectivo açúcar redutor (Figura 12). Estes valores foram convertidos em µg de produto formado por unidade de tempo, por extrapolação dos valores correspondentes numa curva-padrão usando o açúcar-padrão requerido que, neste caso, foi a glucose.

Uma unidade de actividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir uma micromole de equivalente de açúcar redutor, por minuto.

Figura 12 - Exemplo de curva-padrão de glucose.



Relação entre as quantidades crescentes de glucose em μmol e as respectivas absorvências registadas a 575 nm.

#### 4.1.3.2 Determinação da actividade enzimática endógena da cevada

Para avaliar a actividade beta-glucanásica endógena da cevada foi utilizado o kit comercial Azo-Barley Glucan (Megazyme International, Ireland) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante com uma alteração no tempo de incubação, que foi aumentado de 10 minutos para 3 horas (Anexo III) conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2011a). Este kit apresenta um substrato marcado que é despolimerizado pelas  $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ -glucanases presentes na cevada em fragmentos que são solúveis na presença de uma solução precipitante. Após centrifugação da mistura tratada pela solução precipitante, a absorvência registada a 590 nm é relacionada directamente com o nível de actividade  $\beta$ -glucanásica endógena da amostra em estudo.

#### 4.1.3.3 Avaliação da actividade enzimática dos conteúdos gastrointestinais

A avaliação da actividade de enzimas exógenas nas amostras retiradas dos vários compartimentos gastrointestinais foi realizada em placas de Tris-agar (10 mmol/l de Tris-HCl, pH 8, com agar a 2%, p/v) contendo também 0,1% (p/v) de  $\beta$ -glucano (Barley Beta Glucan, Megazyme) ou 0,1% (p/v) de carboximetilcelulose (CM-Cellulose 4M, Megazyme). Estes dois meios, após homogeneização e esterilização por autoclave, foram colocados em placas de Petri. Após solidificação dos meios nas placas de Petri foram feitos pequenos poços nos meios para depósito das amostras.

As amostras dos conteúdos gastrointestinais foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas a 16000x g durante 5 minutos a 4 °C, e foi efectuada a recolha dos sobrenadantes. Em cada poço foram depositados 20 μl de cada amostra. A actividade enzimática foi avaliada, após incubação a 37 °C durante 48 horas, utilizando o corante Vermelho do Congo numa concentração final de 1% (p/v) em 10 mmol/l de Tris-HCl a pH 8,0. Após incubação com o corante durante 30 minutos procedeu-se a lavagens durante 15 minutos com uma solução de NaCl a 1 mol/l. As regiões em torno dos poços cujas amostras demonstraram actividade enzimática apresentaram-se descoradas em relação à cor vermelha da placa.

#### 4.1.4 Avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais

A avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais foi efectuada no Laboratório Professor Pais de Azevedo, na Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (UTL). Para a avaliação da viscosidade dos conteúdos intestinais as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 8600x g e a viscosidade do sobrenadante foi medida com um viscosímetro Brookfield (Modelo LVDVCP-II, Brookfield Engineering Laboratories). A temperatura do copo foi mantida constante a 24 °C.

## 4.2 Ensaio com animais

### 4.2.1 Aspectos comuns

#### 4.2.1.1 Elaboração do alimento composto

O alimento utilizado nos ensaios foi elaborado na Fábrica de Alimentos Compostos existente no Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (UTL). O alimento foi formulado de forma a conter os níveis de nutrientes recomendados pelo National Research Council (1994) e é apresentado no Quadro 4, assim como a composição previsível do alimento. Uma descrição detalhada é apresentada no Anexo IV.

Quadro 4 - Incorporação de ingredientes no alimento composto.

Ingrediente	%
Cevada	55,00
Bagaço de Soja 47%	30,60
Óleo de Soja	5,45
Milho	5,73
Sal	0,25
Carbonato de Cálcio	0,81
Fosfato dicálcico 18%	1,79
DL-Metionina	0,16
Pré-mistura (Minerais e Vitaminas)	0,20
Nível estimado de nutrientes	
Energia (kcal EM/kg MS)	2900
Proteína bruta (%)	20,80
Gordura bruta (%)	7,33
Fibra bruta (%)	4,87

As matérias-primas foram moídas num moinho de martelos, sendo feita a mistura durante 7 minutos e por fim granuladas.



#### **4.2.1.2 Sala e preparação da sala**

Para os ensaios foram utilizadas as instalações do Departamento de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia (UTL). A sala utilizada tem uma área total de 30 m<sup>2</sup>, e um total de 40 gaiolas, cada uma com 2750 cm<sup>2</sup> o que corresponde a aproximadamente 688 cm<sup>2</sup> por animal (4 animais por gaiola). As gaiolas estão dispostas em duas fileiras, cada uma com dois andares. A sala dispõe de sistema de ar-condicionado, ventilação artificial, termómetros para avaliação da temperatura da sala, da gaiola ao nível dos animais e junto da lâmpada. Foram utilizadas lâmpadas de aquecimento, uma lâmpada para cada par de gaiolas, de infravermelhos com 150 watt de potência (Philips Electronics) e a partir dos 21 dias substituídas por lâmpadas brancas de 25 watt (Philips Electronics). Cada gaiola dispõe ainda de um comedouro com 34 cm de comprimento (8,5 cm/ave) e dois bebedouros de pipeta. A temperatura, altura dos bebedouros e comedouros foi regulada diariamente de acordo com os procedimentos recomendados de produção (ROSS, 2009a). A sala foi aquecida antes da entrada dos animais.

Os procedimentos de limpeza e desinfecção são essenciais e indispensáveis na produção animal. A sala foi previamente lavada utilizando o detergente de superfícies Detersan<sup>®</sup> (Sogeval, França), e a desinfecção com TH4+ (CEVA Santé Animale, França), seguida com um vazio sanitário de acordo com as indicações do fabricante. A sala dispõe também de um pedilúvio na entrada para o qual foi utilizado também o desinfectante TH4+ segundo as indicações do fabricante.

#### **4.2.1.3 Frangos**

Foram adquiridos para cada ensaio 240 pintos do dia da estirpe Ross 308, machos, dos quais foram seleccionados 160 que estavam dentro de um intervalo de pesos entre 41 g a 51 g. Estes foram distribuídos aleatoriamente pelas 40 gaiolas, ficando 4 animais por gaiola. Os animais foram identificados individualmente através de anilhas colocadas na asa direita. Os animais foram expostos a luz constante durante todo o ensaio, com distribuição de alimento e água *ad libitum*.

Os ensaios com animais foram conduzidos em concordância com a regulamentação bioética para ensaios com animais segundo o regulamento da Direcção de Serviços de Meios de Defesa da Saúde, Bem-estar e Alimentação Animal, D.G.V., ref. 2682/99.

#### **4.2.1.4 Preparação da enzima para adição ao alimento composto**

A enzima a utilizar foi previamente misturada com cevada do mesmo lote utilizado na elaboração do alimento composto. Pesaram-se 12 kg de cevada moída, que foi colocada a secar em estufa, a 80 °C, durante 2 horas, em tabuleiros, de modo a que a altura de cevada em cada tabuleiro não fosse superior a 2 cm. Para cada tratamento foram posteriormente pesados 3 kg de cevada a ser utilizada como excipiente para a enzima.

Para as enzimas em solução o volume necessário de cada enzima para 100 kg de alimento foi diluído no mesmo tampão (tampão de manutenção) num volume final de 200 ml. Na misturadora, o extracto líquido contendo a enzima foi adicionado lentamente e misturado durante 5 minutos (Misturadora SSantos, Santos, Portugal). A mistura enzimática comercial apresenta-se em pó liofilizado. Esta foi pesada, de acordo com a incorporação pretendida, e adicionada à cevada preparada para servir de excipiente e misturada (Misturadora SSantos, Portugal) durante 5 minutos. Para o tratamento de controlo negativo nada foi adicionado ao excipiente. Procedeu-se depois a uma secagem em estufa a 37 °C durante 12 horas.

#### **4.2.1.5 Preparação diária do alimento**

As enzimas já excipientadas foram adicionadas ao alimento a fornecer aos animais numa taxa de incorporação de 30 g por kg de alimento. O produto foi misturado durante 3 minutos, na misturadora SSantos (Santos, Portugal).

### **4.2.2 Ensaio 1 – Efeitos da incorporação enzimática nos alimentos para aves**

#### **4.2.2.1 Registos**

Os pesos individuais dos animais foram registados semanalmente. O alimento fornecido foi pesado diariamente e os refugos retirados e pesados no final de cada semana. A mortalidade foi registada diariamente. A temperatura da sala foi verificada e registada duas vezes por dia.

### **4.2.3 Ensaio 2 – Comparação de dois mini-celulosomas**

#### **4.2.3.1 Registos**

Os pesos individuais dos animais foram registados semanalmente. O alimento fornecido diariamente foi pesado e os refugos retirados e pesados no final de cada semana. A mortalidade foi registada diariamente. A temperatura da sala foi verificada e registada duas vezes por dia. No final do ensaio foi abatido um animal por gaiola através de injeção endovenosa de uma solução isotónica de 125 mg de Tiopental (Braun, Espanha). Foram medidos e pesados vários compartimentos gastrointestinais (papo, moela, duodeno, jejuno e íleo, ceco) e também recolhidas amostras do conteúdo dos mesmos.

### **4.3 Análise estatística**

A análise estatística foi efectuada com recurso ao teste de análise de variâncias (ANOVA), utilizando o procedimento GLM (General Linear Models) da aplicação informática SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Diferenças entre médias de cada parâmetro analisado foram testadas com o teste de Duncan, com o programa estatístico SAS (2001). A unidade experimental considerada foi a gaiola com 4 animais. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **5. Trabalhos experimentais**

Este trabalho consiste de três trabalhos experimentais principais, divididos pelos pontos 5.2 e 5.3. O ponto 5.1 refere o primeiro passo necessário para a realização dos trabalhos subsequentes, a selecção da cevada para a incorporação no alimento composto. Ao longo deste capítulo são apresentadas as especificidades e fundamento dos procedimentos realizados, os quais já foram descritos em Material e métodos, acompanhados por uma pequena introdução de cada assunto, seguida pelos resultados obtidos e discussão dos mesmos.

## 5.1 Determinação da actividade enzimática endógena da cevada

### 5.1.1 Introdução

Trabalhos anteriores realizados no nosso laboratório revelaram que os níveis de actividade  $\beta$ -glucanásica endógena da cevada têm influência na eficácia de enzimas exógenas utilizadas para suplementar dietas à base de cevada para frangos de carne (Ribeiro *et al.*, 2011a). Sabendo-se que uma maior actividade enzimática endógena da cevada é favorável para o desempenho produtivo das aves, a selecção de uma cevada com baixa actividade  $\beta$ -glucanásica endógena é um passo essencial para uma primeira avaliação de enzimas recombinantes que nos propomos testar, porquanto só nestas condições será vantajoso adicionar enzimas.

### 5.1.2 Resultados e Discussão

Quadro 5 - Actividade enzimática endógena dos lotes de cevada recolhidos, avaliada através do protocolo comercial AZO-BARLEY (Megazyme).

ID	ABS 590 nm		Média	Branco	ABS Corrigida	U/kg
B28	0.274	0.275	<b>0.275</b>	0.079	<b>0.196</b>	<b>127.17</b>
B29	0.370	0.379	<b>0.375</b>	0.079	<b>0.296</b>	<b>190.17</b>
B30	0.458	0.482	<b>0.470</b>	0.079	<b>0.391</b>	<b>250.33</b>
B31	1.785	1.899	<b>1.842</b>	0.079	<b>1.763<sup>1</sup></b>	<b>1114.69</b>
B32	0.534	0.646	<b>0.590</b>	0.026	<b>0.564</b>	<b>359.32</b>
B33	0.881	0.930	<b>0.906</b>	0.026	<b>0.880</b>	<b>558.09</b>
B34	2.244	2.139	<b>2.192</b>	0.085	<b>2.107<sup>1</sup></b>	<b>1331.10</b>
B35	1.606	1.596	<b>1.601</b>	0.087	<b>1.514<sup>1</sup></b>	<b>957.82</b>
B36	1.780	1.743	<b>1.762</b>	0.091	<b>1.671<sup>1</sup></b>	<b>1056.42</b>
B37	2.377	2.152	<b>2.265</b>	0.105	<b>2.160<sup>1</sup></b>	<b>1364.49</b>
B38	1.767	1.815	<b>1.791</b>	0.105	<b>1.686<sup>1</sup></b>	<b>1066.18</b>
B39	1.998	1.950	<b>1.974</b>	0.105	<b>1.869<sup>1</sup></b>	<b>1181.47</b>
B40	0.858	0.937	<b>0.898</b>	0.091	<b>0.807</b>	<b>512.10</b>
B41	2.247	2.323	<b>2.285</b>	0.096	<b>2.189<sup>1</sup></b>	<b>1383.07</b>
B42	1.195	1.212	<b>1.204</b>	0.096	<b>1.108<sup>1</sup></b>	<b>701.73</b>
B43	1.627	1.682	<b>1.655</b>	0.122	<b>1.533<sup>1</sup></b>	<b>969.48</b>
B44	1.730	1.907	<b>1.819</b>	0.122	<b>1.697<sup>1</sup></b>	<b>1072.80</b>
B45	2.143	2.075	<b>2.109</b>	0.122	<b>1.987<sup>1</sup></b>	<b>1255.81</b>
B46	1.516	1.411	<b>1.464</b>	0.122	<b>1.342<sup>1</sup></b>	<b>849.15</b>

ID – identificação do lote; ABS 590nm – valores de absorvência medidos a 590 nm; Média – média aritmética dos dois valores de absorvência medidos; Branco – absorvência do branco de reacção; ABS Corrigida – diferença entre a Média e o Branco; U/kg – aplicação da curva-padrão  $Y = 630 \cdot X + 4$  (y – U/kg, x – ABS Corrigida) para o lote de reagente 60602h. (<sup>1</sup>) Valores acima do limite da curva-padrão.

No Quadro 5 é apresentada a actividade  $\beta$ -glucanásica endógena de 19 amostras de cevada, avaliadas entre 30 de Setembro de 2011 e 10 de Fevereiro de 2012.

A recolha prévia de amostras de cevada e a avaliação da actividade enzimática endógena destas é um importante passo na selecção desta matéria-prima para a incorporação no alimento composto e no processo de tomada de decisão sobre a necessidade ou não de se adicionarem enzimas hidrolíticas ao alimento. Os resultados obtidos mostram uma grande variação na actividade enzimática endógena de diferentes lotes, o que está de acordo com o que já foi verificado em trabalhos realizados por Ribeiro *et al.* (2011a) e Georg-Kraemer *et al.* (2004).

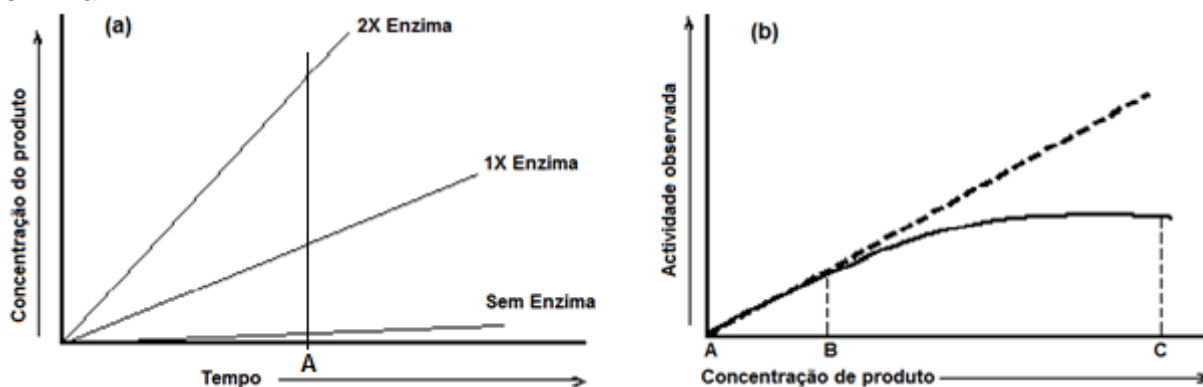
A cevada utilizada para os Ensaio 1 e 2 deste trabalho foi a cevada B28 que apresentou menor actividade enzimática beta-glucanásica. As cevadas B32 a B46 foram analisadas já fora do âmbito destes dois ensaios, apresentando-se, no entanto, os resultados para realçar a variabilidade encontrada entre diferentes lotes de cevada.

## 5.2 Ensaio 1 – Efeitos da incorporação enzimática nos alimentos para aves

### 5.2.1 Introdução

De forma a estudar o efeito do aumento da quantidade de enzima na taxa de reacção enzimática, o substrato deve estar presente em excesso, isto é, a reacção deve ser independente da concentração de substrato. Desta forma a quantidade de produto formado durante um determinado período de tempo vai depender da quantidade de enzima presente (Figura 13a). No entanto, a taxa de reacção com o avançar do tempo pode ser limitada/inibida pelo aumento da concentração de produto (Figura 13b), entre outros factores. Um ensaio que pretenda medir a velocidade de reacção enzimática deve ser desenhado para que a actividade observada seja proporcional à concentração de enzima e que este seja o único factor limitante.

Figura 13 – Taxa de reacção enzimática de ordem zero (independente da concentração de substrato) e efeito do aumento da concentração de produto na actividade observada da enzima.



(a) Ao mesmo tempo A, a quantidade de produto formado é o dobro quando a concentração de enzima é duplicada assim como a taxa de reacção é constante no tempo. (b) Entre A e B a taxa de reacção é constante mas não a partir de B onde atinge um valor limite. Fonte: Worthington Biochemical Corporation (1972).

A avaliação *in vivo* de enzimas recombinantes tem, no entanto, que ter em conta uma panóplia de factores externos que, apesar de todos os cuidados no delineamento experimental, não é possível eliminar ou conseguir contabilizar com precisão. O estudo de actividade de enzimas recombinantes na suplementação de dietas à base de cereais para frangos de carne é feito, normalmente, com base na comparação destas enzimas contra um preparado comercial, equiparando a taxa de incorporação das enzimas a testar com a actividade enzimática do preparado comercial, com um nível incorporação recomendada pelo fabricante e utilizado na prática industrial (Fontes *et al.*, 2004; Guerreiro *et al.*, 2008). Guerreiro *et al.* (2008) sugerem que para a comparação de enzimas recombinantes e avaliação de diferenças entre estas se devam aplicar dosagens mais baixas, sugerindo que os níveis de suplementação utilizados permitam que esteja sempre enzima presente junto do substrato, mascarando diferenças nas taxas de reacção entre diferentes enzimas em estudo.

### 5.2.2 Resultados e Discussão

Para avaliar a possibilidade de utilização de uma dosagem mais baixa de enzima foi realizado um ensaio recorrendo apenas ao suplemento enzimático comercial Rovabio® Excel AP (Adisseo). Este suplemento contém uma mistura de diferentes enzimas hidrolíticas dos hidratos de carbono, produzidas pelo fungo *Penicillium funiculosum* não modificado geneticamente (ver Anexo V para descrição detalhada).

O Quadro 6 mostra os indicadores de crescimento dos animais alimentados com a mesma dieta, mas com diferentes graus de suplementação enzimática, durante um período de 14 dias. A duração de apenas 14 dias deve-se ao facto de se ter verificado que é neste período que as diferenças verificadas entre grupos não suplementados e grupos suplementados com enzimas são maiores (Nahas & Lefrançois, 2001; Fontes *et al.*, 2004). O ensaio decorreu entre 18 de Outubro e 1 de Novembro de 2011.

Quadro 6 - Indicadores de crescimento de frangos alimentados com uma dieta à base de cevada não suplementada (CN) e suplementada com uma mistura comercial de enzimas, beta-glucanases, incorporada de acordo com a recomendação do fabricante 100% (R100), a 75% (R75) e a 50% (R50).

	CN	R50	R75	R100	EPM	P
<b>Peso (g)</b>						
Dia 0	48,97	48,92	49,42	48,98	0,629	0,9358
Dia 7	127,57 <sup>b</sup>	149,54 <sup>a</sup>	150,51 <sup>a</sup>	155,39 <sup>a</sup>	2,475	<0,0001
<b>Dia 14</b>	<b>260,75<sup>b</sup></b>	<b>387,86<sup>a</sup></b>	<b>384,34<sup>a</sup></b>	<b>407,12<sup>a</sup></b>	<b>6,879</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Ganho médio (g)</b>						
Dia 0 a 7	78,60 <sup>b</sup>	100,62 <sup>a</sup>	101,09 <sup>a</sup>	106,42 <sup>a</sup>	2,377	<0,0001
Dia 7 a 14	133,18 <sup>b</sup>	238,32 <sup>a</sup>	235,79 <sup>a</sup>	249,06 <sup>a</sup>	5,565	<0,0001
<b>Total</b>	<b>203,26<sup>b</sup></b>	<b>341,00<sup>a</sup></b>	<b>337,76<sup>a</sup></b>	<b>355,16<sup>a</sup></b>	<b>7,464</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Alimento ingerido (g)</b>						
Dia 0 a 7	122,65 <sup>b</sup>	142,97 <sup>a</sup>	134,69 <sup>a</sup>	143,83 <sup>a</sup>	3,255	<0,0001
Dia 7 a 14	232,06 <sup>b</sup>	344,46 <sup>a</sup>	334,62 <sup>a</sup>	355,32 <sup>a</sup>	6,063	<0,0001
<b>Total</b>	<b>354,71<sup>b</sup></b>	<b>487,43<sup>a</sup></b>	<b>469,31<sup>a</sup></b>	<b>499,15<sup>a</sup></b>	<b>8,017</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Índice de conversão</b>						
Dia 0 a 7	1,56 <sup>a</sup>	1,42 <sup>b</sup>	1,34 <sup>b</sup>	1,35 <sup>b</sup>	0,029	<0,0001
Dia 7 a 14	1,76 <sup>a</sup>	1,45 <sup>b</sup>	1,42 <sup>b</sup>	1,43 <sup>b</sup>	0,029	<0,0001
<b>Total</b>	<b>1,76<sup>a</sup></b>	<b>1,43<sup>b</sup></b>	<b>1,39<sup>b</sup></b>	<b>1,41<sup>b</sup></b>	<b>0,025</b>	<b>&lt;0,0001</b>

<sup>a,b</sup>Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).

Não houve animais mortos ou com sinais clínicos de doença no decorrer do ensaio. Os três grupos de animais alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas apresentaram diferenças significativas ( $P<0,05$ ) relativamente ao grupo controlo (CN), i.e., sem suplementação enzimática. No entanto, não há diferenças significativas entre estes três tratamentos, sugerindo que a concentração de enzimas foi suficiente, mesmo com metade da dosagem recomendada pelo fabricante (R50).

De notar, contudo, que o tratamento R75 apresenta um índice de conversão mais baixo, talvez devido a uma menor ingestão de alimento. Esta melhor performance em relação aos tratamentos com maior quantidade de enzima está por explicar e talvez possa encontrar justificação na disponibilização exagerada de substratos passíveis de alterar a ecologia microbiana intestinal.

Ainda assim, R100 apresenta valores de peso vivo mais elevados e índices de conversão mais baixos que os indicados para esta estirpe de frangos. Isto pode dever-se à elevada incorporação de cevada no alimento, tendo o alimento resultante da mistura uma energia estimada de 2900 kcal EM/kg MS e uma percentagem de proteína bruta estimada de 20,80%, valores ligeiramente abaixo dos valores recomendados para atingir os óptimos produtivos de 3025 kcal EM/kg MS de energia e 22-25% de proteína bruta (ROSS, 2009b). Pode realçar-se aqui, uma vez mais, a importância de uma correcta formulação e o impacto da nutrição na expressão do potencial produtivo animais.

A ausência de diferenças significativas entre uma incorporação a 50% para uma incorporação completa (100%) do suplemento enzimático sugere que em ensaios de actividade enzimática *in vivo* possam ser utilizadas dosagens mais baixas de enzima.



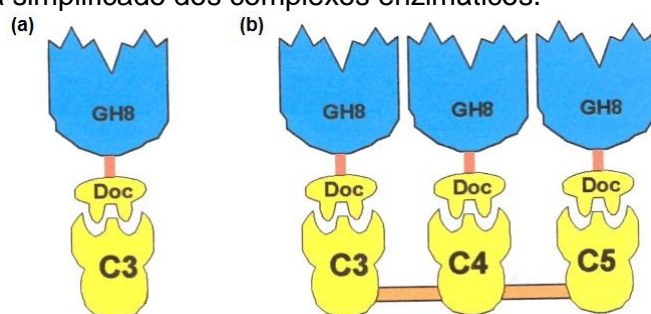
## 5.3 Ensaio 2 - Avaliação da actividade *in vivo* de dois mini-celulosomas

### 5.3.1 Introdução

É normalmente aceite que a integração das enzimas numa estrutura multimolecular como o celulosoma permite uma melhor aproximação e ligação destas aos substratos presentes nas paredes celulares vegetais, incluindo os seus substratos cristalinos, havendo uma acção sinérgica dos diferentes catalizadores expressa numa maior eficácia destes quando integrados no celulosoma, se comparada à acção das mesmas enzimas actuando isoladamente, na degradação de celulose cristalina (Fontes & Gilbert, 2010). Cha *et al.* (2007) verificaram haver um efeito sinérgico, traduzido num aumento de actividade enzimática, proporcional ao aumento do número de coesinas presentes nos celulosomas artificiais desenhados.

Neste trabalho, pretende-se fazer a comparação da eficácia *in vivo* entre dois mini-celulosomas, previamente construídos no nosso laboratório, com uma e três coesinas, respectivamente, na despolimerização de polissacáridos não amiláceos solúveis dos cereais, com vista a uma diminuição dos seus efeitos anti-nutritivos e respectiva melhoria dos índices de crescimento de frangos de carne alimentados com uma dieta à base de cevada. Os constructos utilizados neste trabalho são dois mini-celulosomas com uma e três coesinas do tipo I. A estas coesinas estão ligadas unidades catalíticas através das suas doquerinas nativas, sendo utilizada uma hidrolase glicosídica da família 8, do *Clostridium thermocellum* (Cel8A). As enzimas e respectivos tratamentos serão designados por GH8C1 e GH8C3 correspondendo, respectivamente, aos mini-celulosomas com uma e três coesinas, i.e. com uma ou três enzimas. Uma representação dos mesmos pode ser observada na Figura 14.

Figura 14 - Esquema simplificado dos complexos enzimáticos.



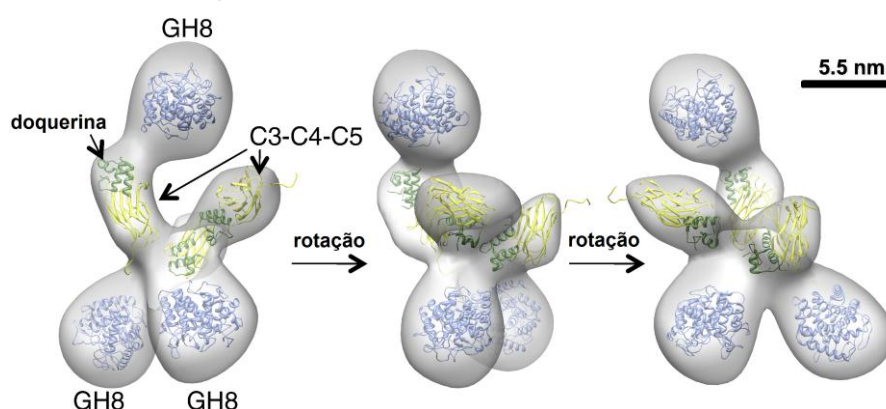
(a) representa a enzima utilizada no tratamento designado GH8C1 e (b) a utilizada no tratamento GH8C3; GH8 – Hidrolase glicosídica, família 8, do *Clostridium thermocellum* (Cel8A); Doc – doquerina tipo I; C – coesina tipo I (coesinas 3, 4 e 5 do CipA do *C. thermocellum*).

A Cel8A foi uma das primeiras celulasas a serem purificadas do sobrenadante do meio de cultura do *C. thermocellum*, descrita pela primeira vez por Cornet, Millet, Béguin & Aubert, em 1983. Trata-se de uma endoglucanase que apresenta um mecanismo de acção que leva à inversão da configuração do carbono anométrico (Alzari, Souchon, & Dominguez, 1996). Esta é uma das principais endoglucanases encontradas no celulosoma do *C. thermocellum*

(Gold & Martin, 2007), pressupondo-se, por isso, que tenha um papel fulcral na hidrólise dos polissacáridos da parede celular vegetal.

A recente resolução da estrutura tridimensional do mini-celulosoma com 3 coesinas (GH8C3) por García-Alvarez *et al.* (2011), apresentada na Figura 15, mostrou que este apresenta uma conformação anti-paralela, a qual pode facilitar o acesso dos domínios catalíticos ao substrato. Uma fracção dos mini-celulosomas mostrou outras conformações que sugerem flexibilidade nas ligações entre as coesinas, o que também sugere uma vantagem de adaptação à conformação do substrato (García-Alvarez *et al.*, 2011).

Figura 15 – Visualizações da estrutura tridimensional obtida por crio-microscopia electrónica do mini-celulosoma com três coesinas (GH8C3), mostrando a estrutura atómica dos módulos das coesinas e doquerinas e o domínio catalítico Cel8A.

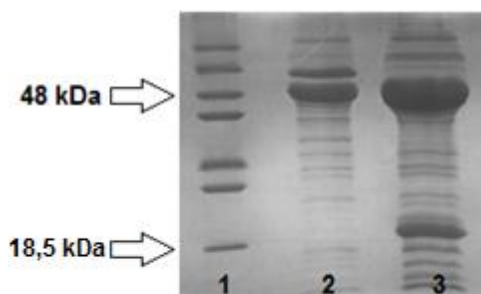


Estruturas atómicas dos módulos das coesinas (amarelo), doquerinas (verde) e domínio catalítico Cel8A (azul), resolvidos isoladamente por cristalografia de raio X. Garcia-Alvarez *et al.* (2011).

### 5.3.2 Resultados e Discussão

Para a comparação dos dois mini-celulosomas, estes foram expressos em *Escherichia coli* e purificados por cromatografia de afinidade (Material e métodos, 4.1.2). A avaliação da expressão e purificação foi feita por SDS-PAGE (Figura 16).

Figura 16 - Análise após electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, SDS-PAGE de 14% (v/v) das fracções purificadas da GH8C3 e GH8C1.



As duas proteínas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas através de cromatografia de afinidade conforme descrito em Material e métodos. Na linha 1 encontra-se o marcador proteico (#MB0820, NZYTech, Portugal). O mini-celulosoma com 3 coesinas (GH8C3) foi carregado na linha 2 e o mini-celulosoma com 1 coesina (GH8C1) na linha 3. A GH8 ligada à doquerina tem uma massa molecular (MM) de 49,85 kDa, o mini-celulosoma com as três coesinas uma MM de 51,21 kDa e o mini-celulosoma com uma coesina uma MM de 18,52 kDa.

A concentração das soluções enzimáticas obtidas após purificação foi calculada pelo método de Bradford conforme descrito em 4.1.2.4. A concentração determinada para GH8C1 foi de 3,708 mg/ml e a de GH8C3 foi de 7,255 mg/ml.

Com a incorporação das enzimas pretende-se que as unidades de actividade enzimática por kg do alimento, nos tratamentos com as enzimas recombinantes, sejam iguais aos providenciados por uma solução comercial utilizada como controlo positivo. Foi utilizado o Rovabio Excel AP (Adisseo) como controle positivo. A actividade catalítica foi determinada sob condições idênticas conforme descrito em 4.1.3.1, utilizando o substrato  $\beta$ -glucano (Barley Beta-Glucan, Megazyme) na concentração de 0,2% (p/v), dissolvido em tampão fosfato/citrato (PC), 50 mM, pH 6,5. Os ensaios foram realizados a 40 °C, durante 2,5 e 5 minutos. O extracto com as enzimas da mistura comercial foi obtido pela ressuspensão de 500 mg do preparado enzimático em 20 ml de tampão PC, 50 mM, pH 6,5, seguida de incubação a temperatura ambiente durante 16 horas, com agitação suave e de centrifugação a 16000x g durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante para determinação da actividade enzimática. A actividade específica calculada para as enzimas recombinantes e para a mistura comercial encontra-se descrita no Quadro 7.

Com base nos resultados obtidos no ensaio anterior (Ponto 5.2) optou-se por uma dosagem da mistura comercial de 50%, o que corresponde a 25 mg de produto por 1 kg de alimento que, com base na actividade específica determinada (Quadro 7) equivale a 142,86 U por kg de alimento. As quantidades a utilizar das duas enzimas recombinantes foram calculadas tendo em base uma incorporação no alimento de 142,86 U/kg.

Quadro 7 – Actividade catalítica das duas enzimas recombinantes GH8C1 e GH8C3 e da mistura comercial Rovabio Excel AP, determinada em tampão PC, 50 mM, pH 6,5 a 40 °C, usando o substrato  $\beta$ -Glucano da cevada (Barley Beta-Glucan, Megazyme).

Enzima	Actividade específica (U/mg)
GH8C1	360,395
GH8C3	211,663
Rovabio Excel AP	5,714

No Quadro 8 são apresentados os parâmetros de desempenho produtivo do ensaio realizado entre 15 de Novembro e 13 de Dezembro de 2011. A mortalidade ao longo do ensaio foi de 2,5%, não estando, aparentemente, as mortes relacionadas com os tratamentos.

Não foram verificadas diferenças na performance dos animais submetidos aos tratamentos com as duas enzimas recombinantes e os animais do grupo de controlo negativo, sendo os seus pesos no final do ensaio semelhantes, assim como os índices de conversão. Os parâmetros produtivos do grupo de controlo positivo correspondem aos valores esperados,

havendo uma diferença significativa deste para os outros tratamentos, sendo os valores ao dia 14 semelhantes comparáveis aos do ensaio anterior (Ponto 5.2) para a mesma dosagem enzimática. Verificou-se no grupo de controlo positivo que as diferenças no IC são significativas nas duas primeiras semanas de idade, não havendo diferenças nas duas semanas subsequentes entre este e os outros tratamentos. No entanto, há uma diferença significativa no índice de conversão global ao longo de todo o ensaio.

Quadro 8 - Indicadores produtivos de frangos de carne alimentados com uma dieta à base de cevada suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura enzimática comercial (CP) e uma dieta não suplementada (CN).

	CN	CP	GH8C1	GH8C3	EPM	P
<b>Peso (g)</b>						
Dia 0	44,94 <sup>b</sup>	45,58	45,12 <sup>b</sup>	46,08 <sup>b</sup>	0,399	0,2026
Dia 7	110,30 <sup>b</sup>	146,11 <sup>a</sup>	114,12 <sup>b</sup>	115,78 <sup>b</sup>	2,669	<0,0001
Dia 14	251,59 <sup>b</sup>	366,90 <sup>a</sup>	254,50 <sup>b</sup>	259,17 <sup>b</sup>	7,443	<0,0001
Dia 21	588,91 <sup>b</sup>	740,96 <sup>a</sup>	586,24 <sup>b</sup>	594,37 <sup>b</sup>	12,946	<0,0001
<b>Dia 28</b>	<b>1050,53<sup>b</sup></b>	<b>1213,81<sup>a</sup></b>	<b>1042,68<sup>b</sup></b>	<b>1024,62<sup>b</sup></b>	<b>22,89</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Ganho médio (g)</b>						
Dia 0 a 7	65,36 <sup>b</sup>	100,52 <sup>a</sup>	68,99 <sup>b</sup>	69,70 <sup>b</sup>	2,708	<0,0001
Dia 7 a 14	140,14 <sup>b</sup>	220,48 <sup>a</sup>	140,38 <sup>b</sup>	141,88 <sup>b</sup>	5,642	<0,0001
Dia 14 a 21	338,94 <sup>b</sup>	369,18 <sup>a</sup>	331,26 <sup>b</sup>	334,67 <sup>b</sup>	7,34	0,0029
Dia 21 a 28	464,45 <sup>b</sup>	467,42 <sup>b</sup>	465,63 <sup>b</sup>	431,45 <sup>b</sup>	13,962	0,2677
<b>Total</b>	<b>1011,74<sup>b</sup></b>	<b>1160,45<sup>a</sup></b>	<b>994,70<sup>b</sup></b>	<b>979,13<sup>b</sup></b>	<b>22,228</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Alimento ingerido (g)</b>						
Dia 0 a 7	93,15 <sup>b</sup>	122,38 <sup>a</sup>	97,10 <sup>b</sup>	92,82 <sup>b</sup>	3,15	<0,0001
Dia 7 a 14	236,57 <sup>b</sup>	329,98 <sup>a</sup>	233,86 <sup>b</sup>	235,41 <sup>b</sup>	6,67	<0,0001
Dia 14 a 21	536,16 <sup>b</sup>	590,72 <sup>a</sup>	525,11 <sup>b</sup>	522,27 <sup>b</sup>	9,811	<0,0001
Dia 21 a 28	834,39 <sup>b</sup>	842,48 <sup>b</sup>	812,28 <sup>b</sup>	798,38 <sup>b</sup>	14,455	0,1383
<b>Total</b>	<b>1702,99<sup>b</sup></b>	<b>1885,55<sup>a</sup></b>	<b>1679,20<sup>b</sup></b>	<b>1651,90<sup>b</sup></b>	<b>29,541</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Índice de Conversão</b>						
Dia 0 a 7	1,43 <sup>a</sup>	1,22 <sup>b</sup>	1,41 <sup>a</sup>	1,33 <sup>ab</sup>	0,028	<0,0001
Dia 7 a 14	1,69 <sup>b</sup>	1,50 <sup>a</sup>	1,67 <sup>b</sup>	1,68 <sup>b</sup>	0,027	<0,0001
Dia 14 a 21	1,58 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>	1,59 <sup>b</sup>	1,56 <sup>b</sup>	0,019	0,5288
Dia 21 a 28	1,80 <sup>b</sup>	1,82 <sup>b</sup>	1,78 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>	0,04	0,5572
<b>Total</b>	<b>1,69<sup>ab</sup></b>	<b>1,63<sup>a</sup></b>	<b>1,69<sup>ab</sup></b>	<b>1,69<sup>b</sup></b>	<b>0,021</b>	<b>0,0254</b>

<sup>a,b</sup> Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).

Os resultados da avaliação do peso e comprimento relativo dos compartimentos gastrointestinais, assim como da viscosidade dos conteúdos destes são apresentados no Quadro 9.

Não foram verificadas diferenças significativas entre o peso relativo dos órgãos avaliados (papo, moela e fígado). No entanto, o comprimento relativo do duodeno, jejuno, íleo e cego dos animais do grupo CP são significativamente menores que os mostrados pelas aves do CN, estando de acordo com o descrito por outros autores (Brenes, Smith, Guenter & Marquardt, 1993; Bedford & Schulze, 1998).

A viscosidade dos conteúdos intestinais não apresenta diferenças significativas apesar da média dos valores de viscosidade dos conteúdos do duodeno e jejuno do grupo de controlo positivo ser menor que o valor médio observado nos outros grupos. No entanto, pelo maior impacto da viscosidade da digesta nas alterações morfológicas do trato digestivo (Angkanaporn *et al.*, 1994), o menor comprimento relativo dos segmentos intestinais observado é sugestivo de que a viscosidade da digesta ao longo do ensaio tenha sido menor nos animais do grupo de controlo positivo em relação aos outros.

Quadro 9 – Peso e comprimento relativo dos compartimentos gastrointestinais, e viscosidade dos respectivos conteúdos, de 40 frangos alimentados com uma dieta à base de cevada, suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura comercial (CP) e não suplementada (CN).

	CN	CP	GH8C1	GH8C3	EPM	P
<b>Peso relativo</b>						
(g/100 g peso vivo)						
Papo	3,89	3,42	3,57	3,81	0,286	0,6421
Moela	13,06	15,24	13,29	13,37	0,871	0,2918
Fígado	29,57	28,59	29,01	30,12	1,129	0,7919
<b>Comprimento relativo</b>						
(cm/ 100g peso vivo)						
Duodeno	23,35 <sup>b</sup>	19,31 <sup>a</sup>	20,59 <sup>ab</sup>	23,08 <sup>b</sup>	1,132	0,0432
Jejuno	57,65 <sup>ab</sup>	52,94 <sup>a</sup>	61,90 <sup>b</sup>	62,56 <sup>b</sup>	1,872	0,0028
Ileo	57,93 <sup>ab</sup>	52,80 <sup>a</sup>	59,41 <sup>b</sup>	64,22 <sup>b</sup>	2,656	0,0372
Cego	14,70 <sup>b</sup>	13,34 <sup>b</sup>	14,56 <sup>b</sup>	14,34 <sup>b</sup>	0,503	0,2329
<b>Viscosidade dos conteúdos (cP)</b>						
Duodeno e Jejuno	11,58	8,78	10,46	12,74	1,488	0,2909
Ileo	15,9	16,08	14,43	16,64	2,109	0,8811

<sup>a,b</sup>Os valores de uma linha que não partilhem o mesmo sobrescrito apresentam diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).

Apesar de não se verificar qualquer efeito nos parâmetros produtivos dos animais suplementados com as enzimas recombinantes quando comparados com o grupo não suplementado, já os dados apresentados referentes aos animais suplementados pela mistura comercial de enzimas (CP) estão de acordo com a generalidade da literatura (Bedford & Schulze, 1998; Guerreiro, *et al.*, 2008; Ribeiro, *et al.*, 2008), tendo havido um efectivo aumento da ingestão de alimento, um maior peso final, menor índice de conversão e uma menor dimensão dos compartimentos gástricos em comparação com os animais alimentados com a mesma dieta mas não suplementada com enzimas.

Para avaliar a viabilidade e estabilidade, *in vivo*, das enzimas recombinantes ao longo do tracto gastrointestinal, as amostras recolhidas imediatamente após o abate, nos diversos compartimentos das aves, foram analisadas relativamente à actividade enzimática conforme descrito em Material e Métodos (4.1.3.3). Foram recolhidas amostras do conteúdo do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e cego. Os resultados são apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 - Avaliação qualitativa da actividade enzimática sobre dois substratos ( $\beta$ -glucano e CM-Celulose) da digesta recolhida de compartimentos gastrointestinais de 40 frangos de carne alimentados com uma dieta à base de cevada, suplementada com duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3), uma mistura comercial (CP) e não suplementada (CN).

	CN	CP	GH8C1	GH8C3
<b>Papo</b>				
$\beta$ -glucano	+ / + / + / - / - / + / + / -	+ / + / + / + / - / + / + / +	- / + / - / - / + / + / + / +	+ / - / + / + / + / + / + / +
CM-Celulose	- / - / - / - / + / - / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -	+ / + / + / - / + / + / - / +	+ / + / + / + / + / + / - / +
<b>Moela</b>				
$\beta$ -glucano	+ / - / - / - / - / - / - / -	- / + / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / + / - / - / - / - / - / -
CM-Celulose	- / - / - / + / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / + / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -
<b>Duodeno</b>				
$\beta$ -glucano	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -
CM-Celulose	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	+ / - / - / - / - / - / - / -
<b>Jejuno</b>				
$\beta$ -glucano	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / + / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -
CM-Celulose	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -	+ / - / - / + / - / - / - / -
<b>Ileo</b>				
$\beta$ -glucano	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / + / - / -	- / - / - / - / - / + / - / -	- / + / - / - / - / - / - / -
CM-Celulose	- / - / - / - / - / - / - / -	+ / - / - / - / - / - / - / -	- / - / + / - / - / - / - / -	+ / + / - / + / - / - / + / - / -
<b>Cego</b>				
$\beta$ -glucano	- / - / - / - / - / - / - / -	- / - / - / - / - / + / - / -	- / + / + / - / - / - / - / -	+ / + / - / + / + / - / - / + / -
CM-Celulose	- / - / - / - / - / + / - / -	- / - / - / - / - / - / - / -	- / + / + / - / - / + / - / -	+ / + / - / - / + / - / - / -

Símbolos indicam presença (+) ou ausência (-) de actividade celulolítica. Substratos  $\beta$ -Glucano (Barley Beta-Glucan, Megazyme) e Carboximetilcelulose (CM-Celulose 4M, Megazyme) em concentração 0,1% (p/v).

O grupo não suplementado (CN) não apresenta actividade detectável ao longo do tracto gastrointestinal, como seria esperado, excepto ao nível do papo (6 de 10 animais).

Em contraste com os indicadores produtivos, o grupo suplementado com a mistura comercial (CP) não apresenta actividade detectada ao longo do tracto gastro-intestinal. Verifica-se, no entanto, uma maior actividade no substrato carboximetilcelulose (CMC) das amostras colhidas dos animais suplementados com as enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) quando comparados com o grupo não suplementado (CN).

Consequentemente, foi feita uma re-avaliação da incorporação das enzimas no alimento, sendo quantificada a actividade de amostras da enzima excipientada (4.2.1.4). Os resultados são apresentados no Quadro 11.

Quadro 11 – Avaliação da actividade enzimática das enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) e da mistura comercial (CP) excipientados e do excipiente (CN).

Tratamento	Actividade
CN	520 U/kg
CP	12107 U/kg
GH8C1	11351 U/kg
GH8C3	8862 U/kg

Actividade determinada com o kit comercial AZO-BARLEY Barley Beta-Glucan (Megazyme), conforme descrito em Material e métodos (4.1.3.2).

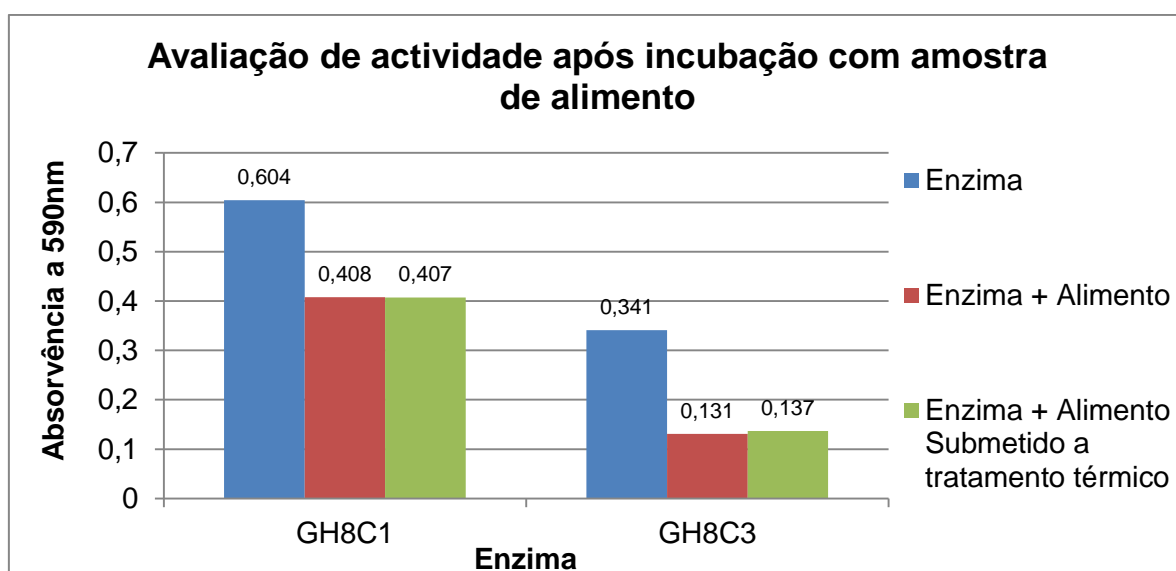
Estes resultados mostram uma actividade semelhante entre CP (12107 U/kg) e GH8C1 (11351 U/kg) e ligeiramente inferior nas amostras de GH8C3 (8862 U/kg). A actividade inferior medida em GH8C3 contrasta com os resultados de detecção qualitativa da actividade ao longo do tracto gastrointestinal das aves onde este grupo apresentou maior número de amostras onde foi detectada actividade enzimática.

Contudo, foi verificada uma maior actividade enzimática da pré-mistura (já com excipiente) do que inicialmente medida na amostra do lote. Esta diferença pode dever-se à falta de homogeneidade dos lotes comerciais de cevada que englobam cereais provenientes de diferentes culturas e à própria sensibilidade do método.

É sugerido por Ribeiro *et al.* (2011a) a possibilidade da presença de factores de inibição específicos das enzimas recombinantes que justificariam a ineficiência destas na suplementação de uma dieta à base de cevada. Ponte *et al.* (2004) verificaram que, após tratamento térmico do extracto proteico de uma dieta à base de trigo, se assistia a uma recuperação da actividade de enzimas recombinantes, sugerindo a presença de factores de inibição termolábeis das xilanases. Considerando a possibilidade de haver uma inibição da actividade das enzimas recombinantes pela presença de factores de inibição termolábeis,

uma amostra do alimento composto não suplementado foi submetida a dois ciclos de esterilização em autoclave (4.1.1). Após o tratamento térmico, as soluções das enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) foram incubadas durante uma hora, em agitação suave, à temperatura ambiente, com o alimento tratado termicamente e com o alimento não tratado termicamente, sendo misturados 25 mg de alimento e 150 µl de solução enzimática, numa diluição final de 1:75000 das soluções originais produzidas. Depois da incubação foram adicionados 150 µl de substrato AZO-BARLEY (Megazyme), misturados e incubados a 40 °C durante 30 minutos, ao fim dos quais foi adicionada a solução precipitante conforme descrito em Material e Métodos (4.1.3.2). Os resultados das actividades enzimáticas são apresentados na Figura 17.

Figura 17 – Avaliação da actividade  $\beta$ -glucanásica das duas enzimas recombinantes (GH8C1 e GH8C3) após incubação com o alimento composto produzido e submetido a tratamento térmico, e não submetido a tratamento térmico.



Absorvência medida a 590 nm após um período de incubação de 30 minutos a 40 °C com o substrato AZO-BARLEY (Megazyme) e adição de solução precipitante conforme descrito em Material e Métodos. O alimento submetido a tratamento térmico foi sujeito a dois ciclos de autoclave.

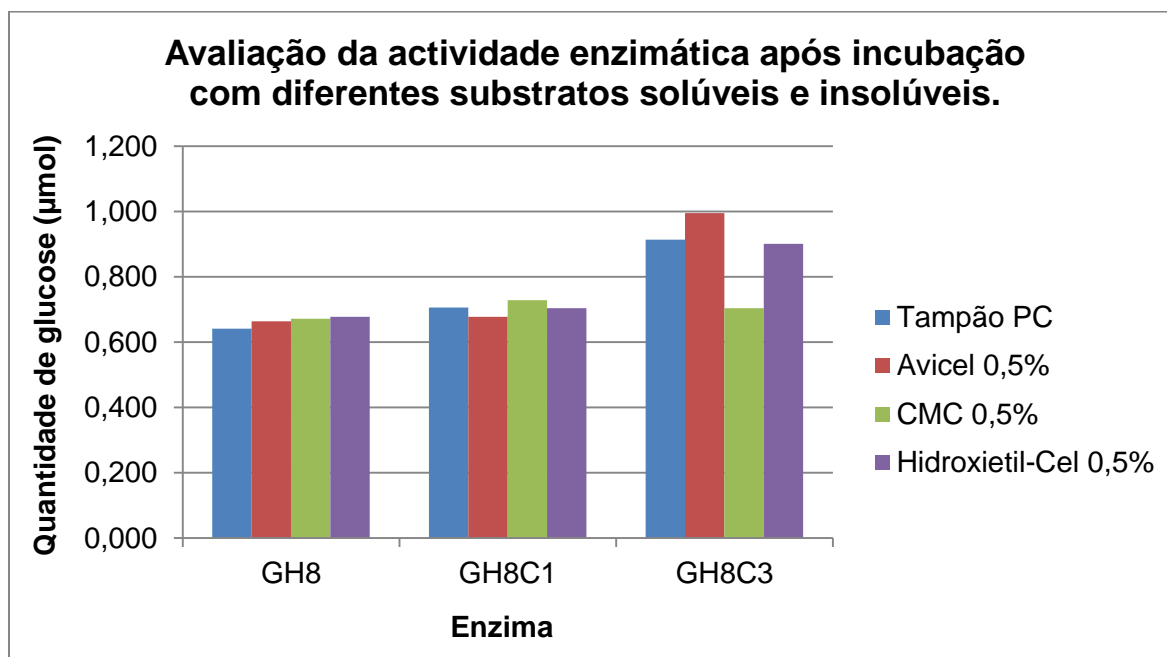
Ao contrário dos resultados obtidos por Ponte *et al* (2004), a actividade  $\beta$ -glucanásica das duas enzimas após incubação com o alimento submetido a tratamento térmico e com o alimento não submetido a tratamento térmico foi semelhante, sugerindo a ausência de factores de inibição enzimática termolábeis que tenham causado a ineficiência das enzimas recombinantes na melhoria dos desempenhos produtivos das aves.

A possibilidade de uma menor actividade das enzimas para os  $\beta$ -glucanos devido a uma maior afinidade destas para a celulose foi também considerada (Fontes & Gilbert, 2010). Com vista a avaliar esta hipótese, as enzimas utilizadas para a suplementação das aves (GH8C1 e GH8C3) assim como apenas o domínio catalítico GH8, foram incubadas, à



temperatura ambiente, em agitação suave, durante uma hora, com soluções contendo 0,5% (p/v) de Avicel (Merck), CM-Celulose (Megazyme), Hidroxietil-celulose (Megazyme) e solução tampão PC (50 mM, pH 6,5). Após incubação, as soluções foram centrifugadas durante 2 minutos, a uma aceleração de 16000x g. O sobrenadante foi avaliado relativamente à presença de actividade enzimática, por quantificação de açúcares redutores formados, conforme descrito em Material e métodos (4.1.3.1), usando o substrato  $\beta$ -glucano (Barley Beta-Glucan, Megazyme). Foi efectuada uma quantificação dos açúcares redutores presentes no sobrenadante pelo mesmo método, não sendo os mesmos detectáveis e, assim, podendo ser descartada a sua influência no ensaio realizado. Os resultados da actividade das enzimas depois de incubadas com os substratos, comparada com a actividade das mesmas incubadas apenas com a solução tampão são apresentados na Figura 18.

Figura 18 – Avaliação da actividade enzimática após incubação com diferentes substratos solúveis e insolúveis.



Quantidade de glucose medida após incubação das enzimas em substrato  $\beta$ -glucano, concentração 0,2% (p/v), a 40 °C, durante 2,5 minutos, e posterior adição de solução DNSA e incubação conforme descrito em Material e métodos (4.1.3.1).

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que a quantidade de açúcares redutores formados após incubação com os diferentes substratos não difere significativamente da quantidade obtida após incubação apenas com a solução tampão, sugerindo não haver uma ligação dos constructos e da GH8 à celulose que reduza a actividade endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-(1 $\rightarrow$ 4)-glucanásica das enzimas.

## 6. Conclusão

A comparação de duas estruturas celulosomais *in vivo* e o conhecimento da maior ou menor eficácia da integração das enzimas numa estrutura complexa (o celulosoma) na degradação de polissacáridos não amiláceos, e consequente melhoria dos índices de crescimento dos frangos de carne, marcará decerto os próximos passos no que diz respeito ao desenho de enzimas recombinantes com vista à suplementação de dietas à base de cevada para frangos de carne.

No entanto, as dificuldades de uma comparação fina entre duas estruturas, quando utilizadas na suplementação de uma dieta à base de cereais para frangos de carne, ficaram patentes neste trabalho e noutros, também aqui referidos.

A variabilidade, uma vez mais constatada, entre colheitas de cevada e, possivelmente, dentro dos mesmos lotes comerciais, da actividade  $\beta$ -glucanásica endógena da cevada, apresenta-se como um primeiro desafio. A obtenção de cevadas de uma única colheita deverá ser efectuada de modo a garantir uma maior homogeneidade do alimento a testar. Também o melhor conhecimento da expressão e regulação das  $\beta$ -glucanases endógenas da cevada deve ser objecto de estudo. Este permitirá uma melhor utilização desta matéria-prima na alimentação animal, com um uso também mais racional de enzimas exógenas, na indústria de malte e um maior controlo aquando da realização de ensaios para a comparação de celulasas recombinantes.

A dosagem de enzimas a utilizar para uma melhor evidenciação de diferenças na actividade de diferentes enzimas é uma questão recorrente. Neste trabalho verificamos que uma dosagem de 50% da mistura comercial Rovabio Excel AP (Adisseo) é suficiente para se verificar diferenças significativas entre um grupo de frangos suplementado e um grupo não suplementado quando alimentado com a mesma dieta.

Contudo, a suplementação enzimática da dieta com as enzimas recombinantes que nos propusemos a testar, e em quantidade idêntica, em termos de actividade enzimática, à da mistura comercial em metade da dosagem recomendada pelo fabricante, não se mostrou eficaz na melhoria dos parâmetros produtivos dos frangos.

Apresentando-se a mistura comercial como uma mistura de diferentes glucanases (celulasas, xilanases e  $\beta$ -glucanases), esta pode em menores dosagens ser suficiente para haver uma melhoria visível das performances produtivas. No entanto pode acontecer que ao adicionar-se uma única glucanase possa haver inibição desta, ou ser insuficiente para a enorme variedade de substratos naturais encontrados no ambiente do tracto gastrointestinal. Não se verificou, no entanto, uma inibição aparente da Cel8A quer por factores presentes no alimento, quer por uma ligação desta à celulose cristalina. No entanto, a Cel8A cliva principalmente ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , as quais se apresentam mais disponíveis, a par com as ligações  $\beta(1\rightarrow3)$ , nos substratos artificiais, podendo não se verificar essa mesma disponibilidade *in vivo*, explicando a ineficiência mostrada no ensaio realizado.

A comparação das duas estruturas celulosomais utilizando um módulo catalítico que seja reconhecida a sua eficácia na suplementação de uma dieta à base de cevada para frangos de carne, como a GH16 do *C. thermocellum* (Ribeiro *et al.*, 2011b), assim como a comparação equivalente para uma dieta à base de trigo, com a utilização de uma xilanase, devem ser considerados.

Por fim, devem ser continuados os esforços no sentido de dotarmos os nossos laboratórios a uma melhor capacidade de avaliação *in vitro* destas enzimas. A utilização de substratos artificiais nem sempre reflecte de forma fidedigna a actividade das mesmas enzimas na hidrólise de substratos naturais (Warren, 1996). O desenvolvimento de técnicas capazes de recriar de forma fiel e reproduzível as condições encontradas pelas enzimas *in vivo* permitirá mais rápidos avanços nesta área da investigação reduzindo, simultaneamente, a necessidade de recorrer à experimentação animal.

## 7. Bibliografia

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of The Cell* (4<sup>a</sup> ed.). Nova Iorque, EUA: Garland Science - Taylor & Francis Group.
- Alzari, P. M., Souchon, H., & Dominguez, R. (1996). The crystal structure of endoglucanase CelA, a family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure*, 4, 265-275.
- Amerah, A., Ravindran, V., Lentle, R., & Thomas, D. (Julho de 2008). Influence of particle size and xylanase supplementation on the performance, energy utilisation, digestive tract parameters and digesta viscosity of broiler starters. *British Poultry Science*, 49, pp. 455—462.
- Angkanaporn, K., Choct, M., Bryden, W. L., Annison, E. F., & Annison, G. (1994). Effects of wheat pentosans on endogenous amino acid losses in chickens. *Journal Science Food and Agriculture*, 66, 399-404.
- Azevedo, C. (2005). *Biologia Celular e Molecular* (4<sup>a</sup> ed.). Lisboa: LIDEL - Edições Técnicas, Lda.
- Bailey, M. J. (1988). A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions. *Applied Microbiology Biotechnology*, 29, 494-496.
- Bayer, E. A., & Lamed, R. (2006). The Cellulosome Saga: Early History. In V. N. Uversky, & I. A. Kataeva, *Cellulosome* (pp. 11-46). Nova Iorque: Nova Science Publishers.
- Bayer, E. A., Belaich, J.-P., Shoham, Y., & Lamed, R. (2004). The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annual Reviews Microbiology*, 58, 521-554.
- Bedford, M. R. (2000). *Enzymes in Farm Animal Production*. Wallingford, Reino Unido: CABI Publishing.
- Bedford, M. R., & Schulze, H. (1998). Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews*, 11, pp. 91-114.
- Bharti, M. (2008). Wet droppings in poultry: a sheer economic loss for industry. *Poultry Planner*, 9, 13-14.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemistry Journal*, 382, 769-781.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brenes, A., Smith, M., Guenter, W., & Marquardt, R. R. (1993). Effect of Enzyme Supplementation on the Performance and Digestive Tract Size of Broiler Chickens Fed Wheat- and Barley-Based Diets. *Poultry Science*, 72(9), 1731-1739.
- Cantarel, B., Coutinho, P., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37, 233-238.
- Caprita, R., Caprita, A., & Cretescu, I. (2011). Effective Extraction of Soluble Non-Starch Polysaccharides and Viscosity Determination of Aqueous Extracts from Wheat and

Barley. *World Congress on Engineering and Computer Science 2011*. São Francisco, EUA.

- Carbó, M. C. (1995). *Zootecnia - Bases de produccion animal: Avicultura clásica y complementaria*. Madrid: Mundi-Prensa Libros, S.A.
- Cha, J., Matsuoka, S., Chan, H., Yukawa, H., Inui, M., & Doi, R. (2007). Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(11), 1782-8.
- Choct, M. (1997). Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. *Feed Milling International*, pp. 13-26.
- Choct, M., & Annison, G. (1990). Anti-nutritive activity of wheatpentosans in broiler diets. *British Poultry Science*, 31, 609-621.
- Choct, M., Dersjant-Li, Y., McLeish, J., & Peisker, M. (2010). Soy Oligosaccharides and Soluble Non-starch Polysaccharides: A review of Digestion, Nutritive and Anti-nutritive Effects in Pigs and Poultry. *The Asian-Australian Association Of Animal Production Societies*, 23, 1386-13-98.
- Choct, M., Hughes, R., Wang, J., Bedford, M., Morgan, A., & Annison, G. (1996). Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *British Poultry Science*, 37, 609-621.
- Cornet, P., Millet, J., Béguin, P., & Aubert, J.-P. (1983). Characterization of Two Cel (Cellulose Degradation) Genes of *Clostridium Thermocellum* Coding for Endoglucanases. *Nature Biotechnology*, 1, 589 - 594.
- Cosgrove, D. J. (Novembro de 2005). Growth Of The Plant Cell Wall. *Nature*, 6.
- Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Current Biology*, 3, 853-859.
- Davies, G., & Henrissat, B. (2002). Structural enzymology of carbohydrate-active enzymes: implications for the post-genomic era [Abstract]. *Biochemistry Society Transactions*, 30, 291–297.
- European Commission (EC). (2000). *The Welfare of Chickens Kept for Meat Production (Broilers)*. Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.
- Edwards, C. (1995). In D. Kristchevsky, & C. & Bonfield, *The physiological effects of dietary fibre: dietary fibre in health and disease* (pp. 58–71). St. Paul: Eagan Press.
- Eurostat. (2008). *Food: From farm to fork statistics*. Luxemburgo: Office for official publications.
- Eurostat. (2011). *Food: From farm to fork statistics*. Luxemburgo: Publications Office of the European Union.
- FAO, F. A. (2010). *Poultry Meat & Eggs - agribusiness handbook*. Itália: FAO.
- Ferket, P. R., & Gernat, A. G. (2006). Factors That Affect Feed Intake of Meat Birds: A Review. *International Journal of Poultry Science* 5 (10), pp. 905-911.
- Field, T. G. (2004). *Scientific farm animal production: an introduction to animal science (8th ed.)*. Nova Jérĩa: Pearson Education, Inc.

- Fontes, C. M., & Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: Highly Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annual Reviews Biochemistry*, 79, 655-681.
- Fontes, C., Ponte, P., Reis, T., Soares, M., Gama, L., Dias, F., Ferreira, LM. (2004). A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of a recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. *British Poultry Science*, 45:5, 648-65.
- Gao, P., Chen, G., Wang, T., Zhang, Y., & Liu, J. (2001). Non-hydrolytic Disruption of Crystalline Structure of Cellulose by Cellulose Binding Domain and Linker Sequence of Cellobiohydrolase I from *Penicillium janthinellum* [Abstract]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 33, 13-18.
- García-Alvarez, B., Melero, R., Dias, F., Prates, J., Fontes, C., Smith, S., Romão M., Carvalho A., Llorca, O. (2011). Molecular architecture and structural transitions of a *Clostridium thermocellum* mini-cellulosome. *Journal Molecular Biology*, 407(4), 571-80.
- Georg-Kraemer, J., Caierão, E., Minella, E., Barbosa-Neto, J., & Cavalli, S. (2004). The (1-3,1-4)-B-Glucanases in Malting Barley: Enzyme Survival and Genetic and Environmental Effects. *Journal of the The Institute of Brewing*, 110(4), 303–308.
- Gilbert, H. J., Sullivan, D. A., Jenkins, G., Kellet, L. E., Minton, N. P., & Hall, J. (1988). Molecular Cloning of Multiple Xylanase Genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *Journal of General Microbiology*, 134, 3239-3247.
- Gilkes, N. R., Warren, R. A., Miller, R. J., & Kilburn., D. G. (1988). Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 10401–10407.
- Gold, N. D., & Martin, V. J. (2007). Global View of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Revealed by Quantitative Proteomic Analysis. *Journal Of Bacteriology*, 6787–6795.
- Gray, G. M. (1992). Starch Digestion and Absorption in Nonruminants. *The Journal Of Nutrition*.
- Grunert, K. G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics*, 32(3), 369-391.
- Guerreiro, C., Ribeiro, T., Ponte, P., Lordelo, M., Falcão, L., Freire, J., Ferreira L., Prates J., Fontes C., Lordelo M. (2008). Role of a family 11 carbohydrate-binding module in the function of a recombinant cellulase used to supplement a barley-based diet for broiler chickens. *British Poultry Science*, 49:4, 446-45.
- Guillén, D., Sánchez, S., & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1241–1249.
- Hashimoto, H. (2006). Recent structural studies of carbohydrate-binding modules. *Cellular and Molecular Life Science*, 63, 2954-2967.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*, 280, 309-316.
- Henrissat, B., & Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 637-644.

- Henrissat, B., Teerib, T., & Warrenc, R. (1998). A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *Federation of European Biochemical Societies*, 352-354.
- Hetland, H., Svihus, B., & Choct., M. (2005). Role of Insoluble Fiber on Gizzard Activity in Layer. *Journal of Applied Poultry Research*, 14, 38–46.
- Hübener, K., Vahjen, W., & Simon, O. (2002). Bacterial Responses to Diferent Dietary Cereal Types and XylanaseSupplementation in theIntestine of Broiler Chicken. *Archiv für Tierernaehrung*, 56, 167-187.
- IACA. (2011). *Produção de alimentos compostos para animais em 2010*. Obtido em 8 de Março de 2012, de Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos Para Animais - IACA:  
<http://www.iaca.pt/index.jsp;jsessionid=40130A66C9CE41BB0908A3474B3FB7DE?page=production&lang=pt>
- IACA. (2012). *Anuário 2011*. Lisboa: IACA.
- Ide, T., Horii, M., Kawashima, K., & Yamamoto, T. (1989). Bile acid conjugation and hepatic taurine concentration in rats fed on pectin. *British Journul of Nutrition*, 62, 539-550.
- INE. (2011). *Estatísticas agrícolas 2010*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- INE. (2012). *Boletim Mensal da Agricultura e Pescas (Fevereiro de 2012)*. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- INE. (1 de Junho de 2011). *Consumo humano de carne per capita (kg/ hab.) por Tipo de carnes; Anual*. Obtido em 6 de Março de 2012, de  
[http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000211&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000211&contexto=bd&selTab=tab2)
- Kaldhusdal, M., & Hofshagen, M. (Julho de 1992). Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. *Poultry science.*, 71, 1145-53.
- Knudsen, K. B. (2001). The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90, 3-20.
- Lamed, R., Setter, E., Kenig, R., & Bayer, E. (1983). Cellulosome: a discrete cell surface organelle of Clostridium thermocellum which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnology Bioengineering Symposium*.
- Lange, C. (2000). Characterisation of the non-starch polysaccharides. In P. J. Moughan, M. W. Verstegen, & M. I. Visser-Reyneveld, *Feed evaluation: principles and practice* (pp. 77-92). Holanda: Wageningen Pers.
- Lavinia, S., Dan, D., Nicolae, C., Eliza, S., Ducu, S., & Călin, J. (2010). Evaluating the anti-nutritive effect of non-starch polysaccharides (NSP) correlated with the nutritional, digestive and productive performance indices in broilers. *Romanian Biotechnological Letters*, 15, pp. 5581-5590.
- Leibovitz, E., & Béguin, P. (1996 ). A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the Clostridium thermocellum cellulosome-integrating protein CipA. *Journal Of Bacteriology*, 3077–3084.
- Lin, P., Shih, B., & Hsu, J. (2010). Effects of different sources of dietary non-starch polysaccharides on the growth performance, development of digestive tract and activities of pancreatic enzymes in goslings. *British Poultry Science*, 51, 270-277.

- Lodish, H. (2000). *Molecular cell biology* (4<sup>a</sup> ed.). Inglaterra: W. H. Freeman and Company.
- Louw, A., Schoeman, J., & Geyse, M. (Abril de 2011). Broiler industry supply chain study with emphasis on feed and feed-related issues. *21st Annual IFAMA World Forum and Symposium*. Frankfurt, Alemanha.
- Mateos, G., Jiménez-Moreno, E., Serrano, M., & Lázaro, R. (2012). Poultry response to high levels of dietary fiber sources varying in physical and chemical characteristics. *Journal of Applied Poultry Research*, 21, 156-174.
- Mateos, G., Lazaro, R., & Gracia, M. (2002). The feasibility of using nutritional modifications to replace drugs in poultry feeds. *Journal Of Applied Poultry Research*, 11, 437–452.
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., & Morgan, C. (1995). *Animal Nutrition* (5<sup>a</sup> ed.). Inglaterra: Longman Scientific & Technical.
- McNab, J. M., & Boorman, K. N. (2002). *Poultry feedstuffs: supply, composition, and nutritive value* (Vol. 26). Inglaterra: Cabi Publishing.
- Miller, G. L. (1959). The use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chemistry*, 31, 426-428.
- Mohammed, A. (1995). Barley varieties, enzyme supplementation, and broiler performance. *Journal Applied Poultry Research*, 4, 230-234.
- Montagne, L. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. . *Animal Feed Science and Technology*, 108, 95–117.
- Morris, E. (1992). Physico-chemical properties of food polysaccharides.
- Moughan, P. (2000). *Feed evaluation: principles and practice* (1<sup>a</sup> ed.). Holanda: Wageningen Pres.
- Nahas, J., & Lefrançois, M. R. (2001). Effects of Feeding Locally Grown Whole Barley With or Without Enzyme Addition and Whole Wheat on Broiler Performance and Carcass Traits. *Poultry Science*, 80, 195–202.
- Novozymes. (2011). *Sales and Markets - 2010 Report*. Obtido em 8 de Março de 2012, de [www.novozymes.com.cn/files/The-Novozymes-Report-2010.pdf](http://www.novozymes.com.cn/files/The-Novozymes-Report-2010.pdf)
- Ponte, P. I., Ferreira, L. M., Soares, M. A., Gama, L. T., & Fontes, C. M. (2004 ). Xylanase Inhibitors Affect the Action of Exogenous Enzymes Used to Supplement Triticum durum-Based Diets for Broiler Chicks. *Poultry Science*, 660-666.
- Reese, E. T., Siu, R. G., & Levinson, H. S. (1950). The Biological Degradation Of Soluble Cellulose Derivatives And Its Relationship To The Mechanism Of Cellulose Hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 59, 485-497.
- Ribeiro, T., Lordelo, M., Ponte, P., Maças, B., Prates, J., Aguiar, F. M., Ferreira, L.M., Fontes, C. (2011a). Levels of endogenous  $\beta$ -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. *Poultry Science*, 90, 1245-1256.
- Ribeiro, T., Lordelo, M. M., Prates, J. A., Falcão, L., Freire, J. P., Ferreira, L. M., Fontes, C. (2011b). The thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum* improves the nutritive value of an highly viscous barley-based diets for broilers. In T. P. Ribeiro, *Rational use of dietary enzymes and lipids to improve broiler performance and meat quality* (pp. 45-62). Lisboa.



- Ribeiro, T., Ponte, P., Guerreiro, C., Santos, H., Falcão, L., Freire, J., Ferreira, L. M. A., Prates, J. A. M., Fontes, C. M. G. A. & Lordelo, M. M. S. (2008). A family 11 carbohydrate-binding module (CBM) improves the efficacy of a recombinant cellulase used to supplement barley-based diets for broilers at lower dosage rates. *British Poultry Science*, 49:5, 600-608.
- Richards, M. P., & Proszkowiec-Weglarz, M. (2007). Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poultry Science*, 86(7), pp. 1478-1490.
- ROSS. (2009a). Ross Broiler Management Manual. Escócia: Aviagen.
- ROSS. (2009b). *ROSS Nutrition Supplement 2009*. Escócia: Aviagen.
- Sacrainie, A., Svihus, B., Denstadli, V., Moen, B., Iji, P. A., & Choct., M. (2012). The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. *Poultry Science*, 91, 693-700.
- Saleem, G., Pirzgoliev, V., Acamovic, T., Houdijk, J., Wiseman, J., Péron, A. (2010). Effect of wheat cultivar, type and xylanase supplementation on Necrotic Enteritis in broilers. *XIIIth European Poultry Conference*. Tours, França.
- Sarikhan, M., Shahryar, H., Gholizadeh, B., M.H., H., Beheshti, B., & Mahmoodnejad, A. (2010). Effects of Insoluble Fiber on Growth Performance, Carcass Traits and Ileum Morphological Parameters on Broiler Chick Males. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12, 531-536.
- Shoseyov, O., Shani, Z., & Levy, I. (2006). Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 70, 283-295.
- Slominski, B. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science*, 90, pp. 2013-2023.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207-234.
- Sumner, J. (1921). Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biology and Chemistry*, 47, 5-9.
- Svihus, B., & Hetland, H. (2001). Ileal starch digestibility in growing broiler chickens fed on a wheat-based diet is improved by mash feeding, dilution with cellulose or whole wheat inclusion. *British Poultry Science*, 42, 633-637.
- Tomme, P., Tilbeurgh, H. V., Pettersson, G., Damme, J. V., Vandekerckhove, J., Knowles, J. (1988). Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, 170, 575-581.
- Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications* (1 ed.). (E. M. Linsmaler-Bednar, Trad.) Estados Unidos da América: John Wiley & Sons, Inc.
- USDA. (Outubro de 2011). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. Obtido em 5 de Março de 2012, de United States Department of Agriculture: [http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf)
- Van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeyssens, M., & Bhikhabhai, R. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. *FEBS Letters*, 204, 223-227.

- Warren, R. (1996). Microbial Hydrolysis of Polysaccharides. *Annual Reviews Microbiology*, 50, 183-212.
- Williams, P., Geraert, P., Uzu, G., & Annison, G. (1997). Factors affecting non-starchpolysaccharide digestibilityin poultry. *Feed manufacturing in Southern Europe: New challenges* (pp. 125-134). Zaragoza: Cahiers Options Méditerranéennes.
- Wootton, M., Acone, L., & Wills, R. (1995). Pentosan levels in Australian and North American feed wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46, 389-392.
- Worthington Biochemical Corporation. (1972). *Manual of Clinical Enzyme Measurements*. Lakewood, NJ: Worthington Diagnostics.

## **ANEXOS**

### **ANEXO I - REAGENTES**

#### **1) Águas**

Água de qualidade laboratorial foi utilizada em todas as experiências. A água destilada foi obtida através do Elix<sup>®</sup>-5 Water Purification System (Millipore Corporation), apresentando uma resistividade superior a 5 MΩ.cm e uma condutividade superior a 0,2 µS/cm a 25 °C. A água bidestilada foi obtida no Milli-Q<sup>®</sup> Water Purification System (Millipore Corporation), apresentando uma resistividade superior a 18,2 MΩ.cm e uma condutividade superior a 0,05 µS/cm.

#### **2) Reagentes**

Reagentes utilizados neste trabalho ordenados por ordem alfabética e distribuídos pelas firmas que os comercializam.

##### **AppliChem**

Cloreto de cobalto

Cloreto de ferro

Cloreto de níquel

##### **Biokar Diagnostics**

Agar

Extracto de levedura

Sulfito de sódio

Triptona

##### **Fluka**

Hidroxietilcelulose

##### **GE Healthcare**

Temed

##### **Megazyme**

Beta-Glucan (Barley)

CM-Cellulose 4M

**Merk**

Avicel

Sulfato de zinco heptahidratado

**NZYTECH**

Acrilamida

**Panreak Química**

Ácido clorídrico

**Sigma-Aldrich**

Ácido 3,5-dinitrosalicílico

Albumina de soro de bovino (ABS)

Ampicilina

Azul Brilhante de Coomassie

Glicerol

Hidróxido de sódio

Imidazol

SDS

**USB**

Hepes

**VWR International**

Ácido acético

Ácido cítrico

Cloreto de amônia

Cloreto de magnésio

Cloreto de manganês tetra hidratado

Cloreto de potássio

Fenol

Fosfato de potássio monobásico

Glucose

Metanol

Sulfato de magnésio

Sulfato de níquel

Sulfato de sódio

## ANEXO II - Meios de cultura e soluções

### 1) Meios de cultura

Meio de cultura	Composição	
<i>*LB (Luria Bertani)</i>	Triptona	10 g/l
	Extracto de levedura	5 g/l
	NaCl	10 g/l
<i>LB agar</i>	Adição de 2% (p/v) de agar ao meio LB	
<i>**SOB</i>	Extracto de levedura	5 g/l
	Triptona	20 g/l
	NaCl	10 mmol/l
	KCl	2,5 mmol/l
	MgCl <sub>2</sub>	10 mmol/l
	MgSO <sub>4</sub>	10 mmol/l
SOC	Meio <b>SOB</b> esterilizado	1 litro
	2% (p/v) solução de glucose	1 mol/l
	(esterilizada com filtro 0,20 µm da Gelman)	

(\*) pH corrigido para 7,5 (com solução de NaOH a 1mol/L em água bi-destilada).

(\*\*) pH corrigido para 7,0 (com solução de NaOH a 1 mol/L em água bi-destilada).

### 2) Meio de cultura de auto-indução (*LBE*)

Para 1 litro

Extracto de levedura	5 g
Triptona	10 g
Glicerol	5 ml
Glucose	0,5 g
Lactose	2 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7 g
NH <sub>4</sub> Cl	2,5 g

Adicionar água destilada para fazer volume final de 900 ml, misturar e esterilizar.

Posteriormente adicionar 1 ml solução 2M MgSO<sub>4</sub> esterilizada, 1 ml de mistura de metais 1000x (ver abaixo) e 100 ml de solução de mistura de fosfato de potássio filtrada e esterilizada (10 ml 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 ml 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 50 ml água destilada).

### Mistura de metais 1000x

0,1 M FeCl <sub>3</sub> -6H <sub>2</sub> O dissolvido em solução 0,1 M HCl	50 ml
1 M MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	1 ml
1 M ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1 ml
0,2 M CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1 ml
0,2 M NiCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1 ml
Água destilada	46 ml

### 3) Soluções tampão

Solução tampão	Composição	
*10 mM imidazol	Imidazol	0,68 g/l
	NaHepes	11,916 g/l
	NaCl	58,44 g/l
	Solução 5M CaCl <sub>2</sub>	1 ml/l
*300 mM imidazol	Imidazol	20,424 g/l
	NaHepes	11,916 g/l
	NaCl	58,44 g/l
	Solução 5M CaCl <sub>2</sub>	1 ml/l
**Tampão PC (50 mM, pH 6,5)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,7 g/l
	Ácido cítrico	2,52 g/l

(\*) Dissolvido em água bi-destilada. pH corrigido para 7,5 (solução NaOH a 1M em água bi-destilada).

(\*\*) Dissolvido em água bi-destilada. pH corrigido para 6,5 (solução HCl a 1M em água bi-destilada).

### 4) Gel de poliacrilamida 14%

Constituintes do gel de resolução (volume final de 10 ml)		Constituintes do gel de concentração (volume final de 10 ml)	
Água	1,2 ml	Água	6,0 ml
40% Acrilamida <sup>1</sup>	3,5 ml	40% Acrilamida <sup>1</sup>	1,0 ml
10% (p/v) SDS <sup>2</sup>	1,0 ml	10% (p/v) SDS <sup>2</sup>	1,0 ml
50% (v/v) Glicerol	1,0 ml	Tampão de concentração <sup>4</sup>	2,0 ml
Tampão de resolução <sup>3</sup>	3,3 ml	10% (p/c) APSO <sub>4</sub>	100 µl
10% (p/v) APSO <sub>4</sub>	100 µl	Temed <sup>5</sup>	20 µl
Temed <sup>5</sup>	10 µl		

<sup>1</sup>NZYTEch (Portugal) #MB04501. <sup>2</sup>Dodecil sulfato de sódio. <sup>3</sup>Solução TRIS 121,1 g/l, pH ajustado para 8,8 com solução HCl 5M em água bi-destilada. <sup>4</sup>Solução TRIS 60,55 g/l, pH ajustado para 6,8 com solução HCl 5M em água bi-destilada. <sup>5</sup>NZYTEch (Portugal) #MB03501.

### **5) Solução corante**

Solução composta por 0,4% (v/v) de Azul Brilhante de Coomassie em 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial.

### **6) Solução descorante**

Solução com 5% (v/v) ácido acético e 20% (v/v) metanol em água destilada.

### **7) Preparação da Solução DNSA**

1. Preparação de solução contendo 1% (p/v) de ácido 3,5-dinitrosalícílico, 0,2% (p/v) de fenol e 1% de hidróxido de sódio em água destilada.
2. Preparação de solução 5% (p/v) de sulfito de sódio em água destilada.
3. Preparação de solução 20% (p/v) de glucose em água destilada.

Dada a instabilidade das soluções 2 e 3 devido a oxidação, estas devem ser guardadas em alíquotas e adicionadas à solução 1 aquando da utilização.

Para 10ml da Solução DNSA final são adicionados 10 ml solução 1, 100 µl solução 2 e 2 µl da solução 3.

### ANEXO III – Protocolo adaptado AZO-BARLEY (Megazyme)

#### Reagentes

##### 1. Preparar **Solução precipitante A** fresca

Para 60 ml utilizar:

2,4 g acetato de sódio

0,24 g acetato de zinco

9 ml água

Acertar pH a 5

Perfazer volume com água para 12ml

Adicionar 48 ml de metoxietanol

##### 2. Extração de **enzima** dos alimentos

Pesar 0,75 g de cevada moída e adicionar 1 ml de Tampão fosfato/citrato (PC), 50 mM, pH 6,5. Colocar em agitação a 37 °C durante 30 minutos. Centrifugar durante 5 minutos, a 16000x g, a 4°C. Recolher o sobrenadante.

##### 3. Substrato **Azo-barley Glucan** (Megazyme)

#### Procedimento

Adicionar 150 µL de Azo-Barley Glucan aquecido a 40 °C a 150 µL de solução contendo enzima aquecida à mesma temperatura e misturar. Incubar a 37 °C durante 3 horas.

Parar a reacção adicionando 900 µl de Solução Precipitante A e agitar vigorosamente. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente e misturar. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 x g. Medir a absorvência a 590 nm de cada amostra e do Branco de reacção contra água destilada.

**Branco de reacção:** Adicionar 900 µl de solução precipitante A a 150 µl de Azo-Barley Glucan e misturar. Adicionar 150 µl de enzima, agitar e centrifugar a 1000 x g durante 10 minutos.

#### Aplicação da curva padrão

Para cada lote é indicada uma curva-padrão pelo fabricante do tipo  $Y = MX + C$ , em que **Y** corresponde à actividade enzimática da amostra em U por kg e **X** à absorvência medida a 590 nm. **M** e **C** são definidos para cada lote de reagente. Cada valor de absorvência deve ser corrigido fazendo-se ao mesmo a subtracção da absorvência obtida para o Branco de reacção.



#### ANEXO IV – Constituição detalhada do alimento composto

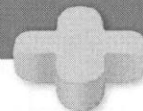
Matéria prima	%
Cevada	55
Bagaço de Soja 47%	30,6
Óleo de Soja	5,45
Milho	5,73
Sal	0,25
Carbonato de Cálcio	0,81
Fosfato dicálcico 18%	1,79
DL-Metionina	0,16
Pre-mistura <sup>1</sup> (Minerais e Vitaminas)	0,2

<sup>1</sup> Pre-mistura de vitaminas e minerais. Fornece por kg de alimento: vitamina A, 9000 IU; vitamina D3, 2100 IU; vitamina E, 20 mg; ácido nicotínico, 30 mg; vitamina B12, 0,12 mg; ácido pantoténico, 10 mg; vitamina K3, 2 mg; tiamina, 1 mg; riboflavina, 4,2 mg; vitamina B6, 1,7 mg; ácido fólico, 0,5 mg; biotina, 0,5 mg; Fe, 80 mg; Cu, 10 mg; Mn, 100mg; Zn, 80 mg; Co, 0,2 mg; I, 1,0 mg; Se, 0,3 mg; monensina, 100 ppm.

Nível estimado de nutrientes	
Energia (kcal EM/kg MS)	2900
Proteína bruta (%)	20,8
Gordura bruta (%)	7,3324
Fibra bruta (%)	4,8746
Cinzas totais (%)	5,7354
Amido (%)	31,7734
Amido+Açúcares (%)	35,8281
Lisina (%)	1,1091
Metionina (%)	0,4639
Metionina + Cistina (%)	0,82
Treonina (%)	0,7689
Triptofano (%)	0,2626
Fósforo total (%)	0,7155
Fósforo dissolvido (%)	0,41
Cálcio (%)	0,92
Sódio (%)	0,1311
Potássio (%)	0,9063
Cloro (%)	0,2247
Acido linoleico (%)	3,8524

# Rovabio® Excel AP

Padrão de Qualidade



## 1. Descrição do produto

**Rovabio® Excel AP** é um pó concentrado cujas principais atividades enzimáticas são a xilanase e a  $\beta$ -glucanase obtidas da fermentação do *Penicillium funiculosum*. Esse produto hidrolisa pentosana e  $\beta$ -glucanase em matérias-primas vegetais.

**Efeito:**

- Melhora o valor nutricional de rações contendo diferentes tipos de cereais (milho, trigo, aveia, cevada...) e farelo de sementes oleaginosas (soja, girassol, canola...);
- Reduz a viscosidade do conteúdo intestinal;
- Reduz a concentração de amônia na cama de frango.

## 2. Composição

Principais substâncias ativas :

Endo - 1,4 -  $\beta$  - xylanase : N° EC 3.2.1.8.

Endo - 1,3 (4) -  $\beta$  - glucanase : N° EC 3.2.1.6.

E mais outras 17 atividades enzimáticas, incluindo celulase (endo-1,4- $\beta$ -glucanase)

## 3. Especificações

**Aparência:** pó

**Coloração:** do bege claro ao bege escuro devido a coloração natural do veículo farinha de trigo

**Atividades mínimas:**

Endo -1,4 - $\beta$ - xilanase – N° EC 3.2.1.8:	22.000 unidades visco/ g (equivalente a 1.400 unidades AXC/ g)
---	---

Endo-1,3 (4) - $\beta$ - glucanase - N° EC 3.2.1.6:	2.000 unidades AGL / g
---	------------------------

1 unidade de endo 1,4 -  $\beta$  - xilanase é a quantidade de enzima de que irá hidrolisar o substrato, reduzindo a viscosidade da solução padrão de uma unidade de fluidez relativa / min / g de enzimas em condições de laboratório (viscosímetro desenvolvido por Orange Leaf company).

1 unidade AXC se define pela liberação dos oligômeros não precipitáveis por etanol a partir de um xilano associado a um cromóforo correspondente a uma absorbância de 1,23 unidades a 590 nm.

1 unidade AGL se define pela liberação dos oligômeros não precipitáveis por etanol a partir de um glucano associado a um cromóforo, correspondente a uma absorbância de 0,82 unidades a 590 nm.

## 4. Validade do produto

12 meses a partir da data de fabricação em embalagem original fechada, em local seco e fresco (mantido abaixo de 30° C).

## 5. Embalagem

Saco em caixa de papelão de 25 kg (500 kg/ pallet)

## 6. Análises Típicas\*

- Produto de fermentação livre de microorganismos, diluído em um veículo de farinha de trigo.
- Densidade: 0.40 a 0.60
- Tamanho da partícula: - acima de 500 µm: máximo de 10%; - entre 100 e 500 µm: 85 a 90%

\* Estes dados são resultados de medições feitas em amostragens representativas, porém não pode ser considerado como garantia do produto.

## 7. Condições de uso do produto

- Alimentação animal  
Pode ser incorporado nas rações fareladas ou peletizadas processadas em temperaturas abaixo de 85°C
- Regulamentação  
FDA: registro permanente para aves e suínos  
UE: registro permanente (E 1604) para frango de corte, poedeiras, perus, patos, leitões e suínos em crescimento
- Dose recomendada: Xilanase: 1.100 unidades visco /kg de ração (equivalente a 70 AXC unidades /kg);  
β glucanase: 100 AGL unidades /kg de ração, **equivalente a 50 g de Rovabio® Excel AP por tonelada de ração.**

O concentrado pode ser diluído em premix antes de ser incorporado na ração.  
Recomendamos checar a atividade enzimática em rações, utilizando o Rovabio Test Kit.

## 8. Métodos de Análise

Dosificação da atividade endo - 1,4 - β - xilanase

**Referência RPCL - Q4.50 - versão 3.2**

O princípio do método de análise se baseia na hidrólise enzimática de uma solução padrão de arabinoxilano de trigo e a atividade é determinada pela diminuição da viscosidade relativa dessa solução. A medição se faz com um viscosímetro desenvolvido pela Orange Leaf Company.

**- Referência RPCL Q4.33 - versão 3.3**

Medição da absorbância a 590 nm permite determinar a atividade endo - 1,4 - β - xilanase mediante um método colorimétrico com um substrato cromóforo.

Dosificação da atividade endo - 1,3 (4) - β - glucanase

**- Referência RPCL - Q4.32 versão 4.1**

Medição da absorbância a 590 nm permite determinar a atividade da endo - 1,3 (4) - β - glucanase mediante um método colorimétrico com um substrato cromóforo.

Dosificação da atividade Celulase (endo 1,4- β - glucanase)

**- Referência Q4.22B - versão 3.6**

A reação catalizada pela celulase afeta a hidrólise das ligações endo 1,4 - β - D - glucosídica da celulose (liquenina e β - D - Glucanos dos cereais) para formar β - 1,4 glucanos - oligosacarídeos.

Para receber os métodos de análise entre em contato com a Adisseo.

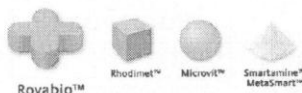
## 9. Segurança

Referência : Fichas de segurança do Rovabio® Excel AP versão 2.04

O manuseio do produto pode causar reações alérgicas por inalação.

Uso na ração: uma vez incorporado na ração, o produto oferece todas as garantias de segurança originais.

Última atualização: 30/09/2009



Para maiores informações, visite nosso site: [www.adisseo.com](http://www.adisseo.com)

42, Avenue Aristide Briand - BP 100 - 92164 Antony cedex - France  
Tél. : + 33 (0)1 46 74 70 00 - Fax : + 33 (0)1 40 96 96 96

**ADISSEO**

**Adding Difference**